

Metabolsk fleksibilitet i humane skjelettmuskelceller

Masteroppgave for graden Master i Farmasi

Anne Fjørkenstad



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2008

Metabolsk fleksibilitet i humane skjelettmuskelceller

Masteroppgave for graden Master i Farmasi

Anne Fjørkenstad



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2008

Veiledere

Professor Arild Chr. Rustan

Professor G. Hege Thoresen

Stipendiat Nina Pettersen Hessvik

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden fra juni 2007 til mai 2008.

Jeg vil gjerne få takke mine veiledere, professor Arild Chr. Rustan og professor G. Hege Thoresen, for god oppfølging, rådgivning og støtte gjennom hele året. Takk for all kunnskap og entusiasme fra deres side, og for uvurderlig hjelp i skriveprosessen.

Takk til stipendiat Nina Pettersen Hessvik for å ha svart på alle mine små og store spørsmål som har oppstått gjennom året.

Stor takknemlighet rettes også til Mari-Ann Baltzersen for veiledning i forbindelse med de ulike metodene og for opplæring og hjelp i arbeidet på cellelaboratoriet. Takk til Hilde Nilsen som ga meg opplæring i Westernblotting.

Samtidig vil jeg benytte anledningen til å takke Marit for all hjelp, og resten av masterstudentene på lesesalen for en hyggelig tid sammen.

Blindern, mai 2008

Anne Fjørkenstad

Innhold

SAMMENDRAG	7
FORKORTELSESLISTE	9
1. INNLEDNING	11
1.1 TYPE 2-DIABETES OG METABOLSK SYNDROM	11
1.2 INSULINRESISTENS OG SKJELETTMUSKEL	12
1.3 METABOLSK FLEKSIBILITET	14
1.4 GLUKOSE- OG FETTMETABOLISMEN I SKJELETTMUSKEL	16
1.4.1 Glukosetransport.....	16
1.4.2 Insulinsignalering	16
1.4.3 Insulinreseptoren	16
1.4.4 Insulinsignalering via type 1A fosfatidylinositol 3`kinase	17
1.4.5 Insulinsignalering via mitogenaktivert proteinkinase	17
1.4.6 Fettmetabolismen	18
1.5 SUBSTANSER SOM BLE BENYTTET I PREINKUBERING AV SKJELETTMUSKELCELLER.....	20
1.5.1 Palmitinsyre	20
1.5.2 Oljesyre	20
1.5.3 Eikosapentaensyre.....	20
1.5.4 Linolsyre.....	20
1.5.5 Tetradecyltioeddiksyre	20
1.5.6 GW501516	21
1.5.7 L-karnitin	21
1.6 HUMANE SKJELETTMUSKELCELLER.....	21
1.7 HENSIKT.....	22
2. MATERIALER OG METODER.....	23
2.1 MATERIALER	23
2.2 DONORKARAKTERISTIKA	24
2.3 CELLEDYRKNING.....	24

2.3.1	<i>Utsåing av satelittceller</i>	24
2.3.2	<i>Vekst av satelittceller og differensiering til myotuber</i>	25
2.4	“MULTIWELL FUEL HANDLING”	25
2.4.1	<i>Prinsipp</i>	25
2.4.2	<i>Substrat-oksidasjonsforsøk med radioaktiv fettsyre</i>	26
2.4.3	<i>Substrat-oksidasjonsforsøk med radioaktiv glukose</i>	27
2.4.4	<i>“Scintillation proximity assay” (SPA)</i>	28
2.4.5	<i>Proteinmåling</i>	29
2.4.6	<i>Lipidfiltrasjon</i>	29
2.5	WESTERNBLOTTING	30
2.5.1	<i>Prinsipp</i>	30
2.5.2	<i>Utsåing av satelittceller</i>	30
2.5.3	<i>Forbehandling og høsting av myotuber</i>	30
2.5.4	<i>Proteinmåling</i>	31
2.5.5	<i>Gel-elektroforese</i>	31
2.5.6	<i>Blotting</i>	32
2.5.7	<i>Deteksjon og kvantifisering</i>	32
2.6	STATISTISK ANALYSE	33
3.	RESULTATER	34
3.1	FORBEHANDLING MED TTA I PROLIFERASJONSPERIODEN, DIFFERENSIERINGSPERIODEN ELLER BEGGE PERIODER	34
3.2	EFFEKTER AV FORBEHANDLING MED ULIKE FETTSYRER, TTA, GW501516 OG AKUTT TILSETNING AV GLUKOSE PÅ OLJESYREMETABOLISMEN	35
3.3	EFFEKTER AV FORBEHANDLING MED ULIKE FETTSYRER, TTA OG AKUTT TILSETNING AV GLUKOSE PÅ PALMITINSYRE-METABOLISMEN	40
3.4	SUPPRESSIBILITET, ADAPTERBARHET OG METABOLSK FLEKSIBILITET I HUMANE SKJELETTMUSKELCELLER	42
3.4.1	<i>Suppressibilitet av glukose på fettsyreoksidasjonen</i>	42
3.4.2	<i>Fettsyreoksidasjonens adapterbarhet</i>	43
3.4.3	<i>Metabolsk fleksibilitet in vitro</i>	45
3.4.4	<i>Effekt av L-karnitin på oljesyremetabolismen og suppressibilitet av glukose</i>	46

3.5	EFFEKTER AV FORBEHANDLING MED ULIKE FETTSYRER, TTA, GW501516 OG AKUTT TILSETNING AV INSULIN PÅ GLUKOSEMETABOLISMEN	48
3.6	EFFEKTER AV FORBEHANDLING MED ULIKE FETTSYRER OG GW PÅ INSULINSIGNALERINGEN	51
4.	DISKUSJON	54
4.1	FETTSYRE- OG GLUKOSEEFFEKTER PÅ HUMANE SKJELETTMUSKELCELLER.....	54
4.1.1	<i>Effekter av behandling med ulike fettsyrer</i>	<i>54</i>
4.1.2	<i>Effekter av akutt tilsetning av glukose.....</i>	<i>55</i>
4.2	METABOLSKE PARAMETERE	56
4.3	GLUKOSEMETABOLISME.....	58
4.4	EFFEKTER AV FORBEHANDLING MED L-KARNITIN	58
4.5	INSULINSIGNALERINGEN	59
5.	KONKLUSJON	60
	KILDELISTE.....	61
	APPENDIKS	64

Sammendrag

Skjelettmuskel er hovedorganet for oksidasjon av lipider og glukose. Vanligvis oksideres glukose til energi under insulinstimulering etter et måltid, mens oksidasjon av fettsyrer stiger ved faste og ved vedvarende trening. En viktig egenskap i muskel er at den tilpasser seg disse to motsatte fysiologiske tilstandene. Dette skiftet i energiutnyttelsen omtales som metabolsk fleksibilitet, og den ser ut til å være svekket ved insulinresistens, fedme og type 2-diabetes. Vi har undersøkt effekten av å forbehandle humane skjelettmuskelceller med ulike fettsyrer og PPARagonister på fettsyre- og glukosemetabolismen i cellene ved ulike metabolske forhold.

Effekten av 24 timers forbehandling med ulike fettsyrer (100 μ M) på akutt ^{14}C -fettsyremetabolisme i humane skjelettmuskelceller i kultur ble undersøkt med og uten tilstedeværelse av glukose (5 mM). Suppressibilitet er definert som evnen glukose har til å undertrykke fettsyreoksidasjonen. Evnen muskelcellene har til å øke fettsyreoksidasjonen ved tilførsel av økende konsentrasjon av fettsyre defineres som adapterbarhet. *In vitro* metabolsk fleksibilitet ble definert som evnen muskelcellene har til å endre fettsyreoksidasjonen ved overgang fra "fastende fase" (høy fettsyrekonsentrasjon, lav glukosekonsentrasjon) til "postprandial fase" (lav fettsyrekonsentrasjon, høy glukosekonsentrasjon). ^{14}C -glukosemetabolisme og insulinsignalerings ble undersøkt for å se om eventuelle effekter av forbehandling med fettsyrene på glukose- og insulinresponser kunne sammenlignes med de metabolske parameterne.

Forbehandling av myotuber med ulike fettsyrer, TTA og GW501516 i 24 timer påvirket cellenes evne til å oksidere substrater i mediet i ulik grad. Metabolsk fleksibilitet og adapterbarhet var signifikant økt etter forbehandling med eikosapentaensyre (EPA) sammenlignet med andre behandlinger. Suppressibilitet var også signifikant økt etter forbehandling med EPA sammenlignet med oljesyre og palmitinsyre. Forbehandling med linolsyre resulterte også i en signifikant økning av suppressibilitet sammenlignet med oljesyre, og signifikant økt adapterbarhet sammenlignet med kontroll, oljesyre og GW, mens TTA og GW ga mindre klare effekter på de beregnede metabolske parameterne. Forbehandling med L-karnitin samtidig med fettsyrer resulterte i økt CO_2 -produksjon fra oljesyre, mens insulinstimulert CO_2 -produksjon fra ^{14}C -glukose ble redusert.

Fettsyrebehandling ga ingen klar effekt på glukoseopptaket i cellene. Effekten av insulin på Akt-fosforylering ble ikke signifikant endret etter forbehandling med fettsyrer eller GW.

Resultatene fra denne oppgaven antyder en gunstig effekt av flerumettede fettsyrer (PUFA) på metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskel.

Forkortelsesliste

ACBP	Acyl-CoA bindende proteiner
aPKC	Atypiske proteinkinase C
ATP	Adenosintrifosfat
BSA	Bovint serum albumin
CA	Celleassosiert radioaktivitet
Ci	Curie
CO ₂	Karbondioksid
CoA	Coenzym A
CTP1	Karnitin palmitoyltransferase-1
DAG	Diacylglycerol
dH ₂ O	Destillert vann
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle medium”
DMSO	Dimetylsulfoksid
DOG	Deoksyglukose
DPBS	“Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline”
ECL	“Enhanced chemiluminescence”
ECM	Ekstracellulær matriks
EPA	Eikosapentaensyre
ERK	Ekstracellulær signalregulert kinase
FABP	Fettsyrebindende protein
FAT/CD36	Fettsyretranslokase
FATP	Fettsyretransportprotein
FCS	Føtalt kalveserum
FFA	Frie fettsyrer
GLUT	Glukosetransportør
Grb-2	“Growth factor receptor binding protein-2”
GS	Glykogensyntase
GSK3	Glykogensyntasekinase 3
GTP	Guanosintrifosfat
GW	GW501516
HDL	“High density lipoprotein”
HRP	“Horseradish Peroxidase”

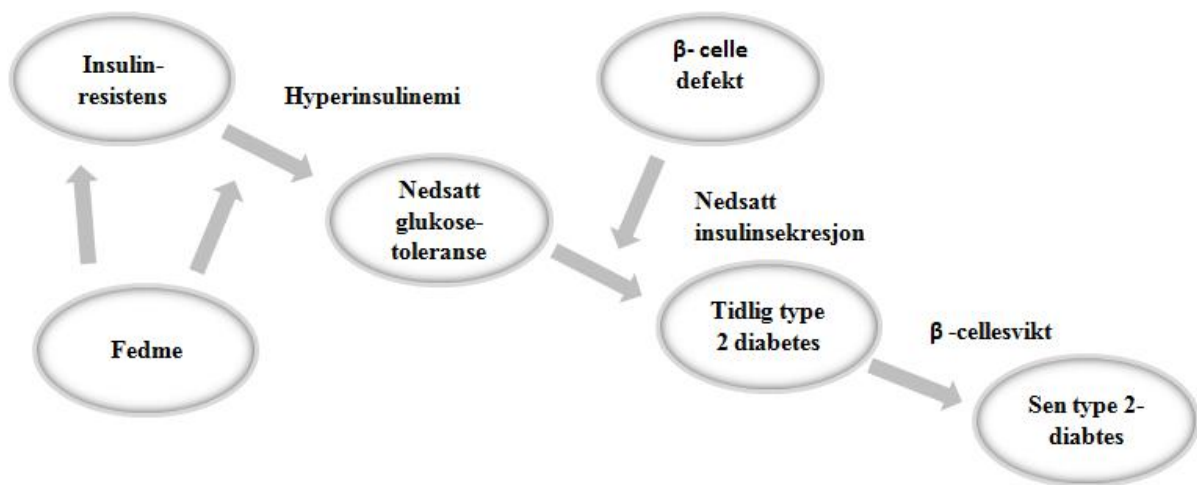
IR	Insulinreseptor
IRS	Insulinreseptorsubstrat
MAPK	Mitogenaktivert proteinkinase
MCD	Malonyl-CoA dekarboxylase
MEK	MAP-ERK-kinase
OA	Oljesyre
PA	Palmitinsyre
PBS	“Phosphate buffered saline” (høstebuffer)
PDK-1	Fosfoinositidavhengig kinase-1
PI3K	Fosfatidylinositol 3` kinase
PIP ₃	Fosfatidylinositol-3-fosfat
PKB	Protein kinase B
PPAR	Peroksisom-proliferator-aktivert-reseptor
PUFA	Flerumettede fettsyrer
Rpm	Omdreiningar per minutt
SDS	Natrium dodecylsulfat
SEM	Standardfeil
SH2	”Src Homology-2”
Shc	Src-homologi og kollagen homologi adaptor protein
SHP2	Tyrosin fosfatase
SOS	”Son-of-sevenless”
SPA	”Scintillation proximity assay”
T2D	Type 2-diabetes
TAG	Triacylglyserol
TEMED	“Tetramethylethylenediamine”
TTA	Tetradecyltioeddiksyre
T-TBS	Tween trisbufret saltløsning

1. Innledning

1.1 Type 2-diabetes og metabolsk syndrom

Diabetes mellitus er en av våre vanligste folkesykdommer og spesielt type 2-diabetes (T2D) er et stadig økende problem i dagens samfunn. Prevalensen er sterkt økende. I 2005 estimerte Verdens helseorganisasjon (WHO) at omtrent 217 millioner mennesker i verden led av diabetes, og WHO antar at tallet vil øke til minst 366 millioner i 2030. T2D utgjør omtrent 90 % av diabetestilfellene [1]. Det er sannsynlig at T2D også kommer til å dominere tilfellene av diabetesformene blant barn og ungdom i fremtiden [2]. T2D er en kompleks og kronisk metabolsk sykdom karakterisert av økte glukosenivåer i plasma [3]. Den metabolske forstyrrelsen er et resultat av utilstrekkelig insulinsekresjon fra pankreas og/eller redusert insulineffekt (insulinresistens) i perifere vev, eller kronisk forhøyet insulinkonsentrasjon. Insulinresistens innebærer at den glukosesenkende effekten av en gitt insulinkonsentrasjon er mindre enn normal. Det kreves dermed høyere insulinnivåer for å oppnå samme reduksjon av glukosekonsentrasjonen hos et individ med insulinresistens, enn hos et individ med normal insulinfølsomhet. Som kompensasjon for insulinresistensen, frisettes mer insulin fra endokrin pankreas. Hyperinsulinemi er derfor en markør på insulinresistens [4], men kan muligens også i seg selv gi insulinresistens [5]. T2D er en sykdom som utvikles over flere år, og pasienten antas å først ha vært gjennom en fase kalt nedsatt glukosetoleranse [6] (figur 1.1). Individer med nedsatt glukosetoleranse har hyperglykemi etter en glukosebelastning, men glukosenivået reduseres til det normale igjen, til tross for at det tar lenger tid enn hos individer med normal glukosetoleranse. Nedsatt glukosetoleranse kan ses på som en mellomliggende fase mellom normal glukosetoleranse og diabetes [7]. Tilstanden er assosiert med økt risiko for å utvikle T2D og kardiovaskulær sykdom, sammenlignet med individer som har normal glukosetoleranse. I løpet av en ti-års periode vil opp til 50 % med redusert glukosetoleranse utvikle T2D [7]. Individer med T2D har økt risiko for mikrovaskulære komplikasjoner i organer som nyrer, øyne og nerver, og makrovaskulære komplikasjoner som hjerte-kar sykdom, slag og perifer vaskulær sykdom [6]. Kardiovaskulær sykdom er to til fem ganger vanligere hos pasienter med T2D enn hos individer uten diabetes [4]. T2D er oftest en del av en hyppig forekommende tilstand (sykdomskompleks) som sammenfattes i begrepet metabolsk syndrom. Det metabolske

syndromet gir en opphoping av risikofaktorer for hjerte- og karsykdom. Syndromet innebærer abdominal (visceral) fedme, sammen med tilstedeværelsen av minst to av disse faktorene: hypertensjon, dyslipidemi (høye triglyseridnivåer, lav HDL-konsentrasjon) og høy fastende plasmaglukose [8]. Flere risikofaktorer angir større sannsynlighet for å utvikle T2D og kardiovaskulære hendelser. Siden fedme er knyttet opp til syndromet, er vekttap viktig for å bedre insulinsensitiviteten, og dermed unngå utvikling og progresjon av insulinresistens og T2D [9]. Kosthold og fysisk aktivitet er viktige faktorer som reduserer risiko for utvikling av insulinresistens og diabetes [4].

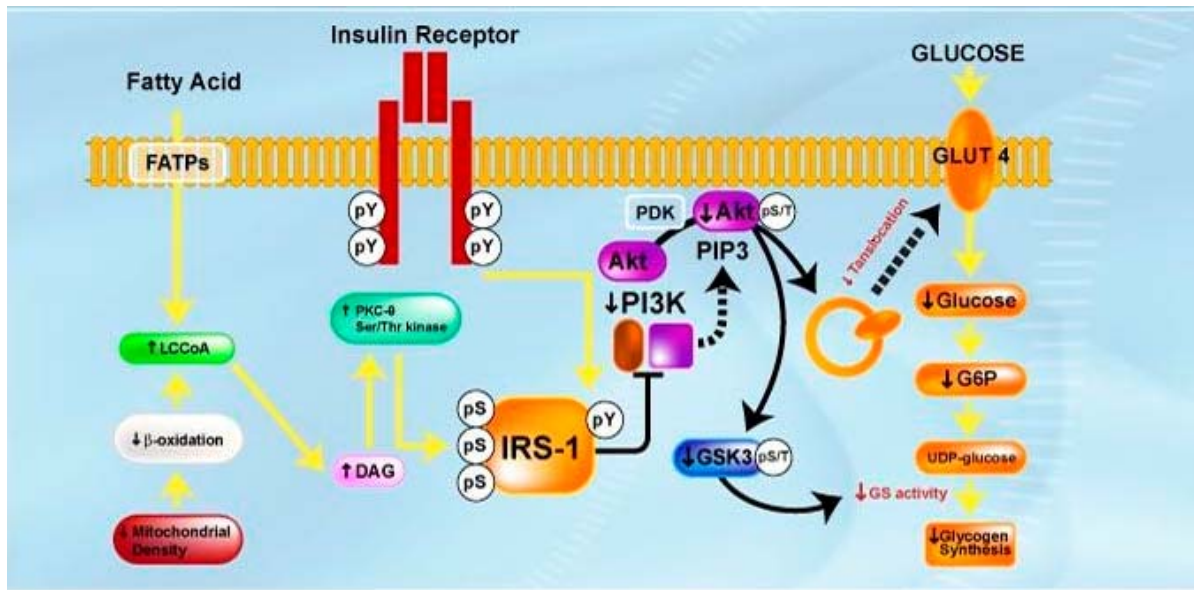


Figur 1.1: Skematisk fremstilling av utvikling av T2D. Abdominal fedme kan gi insulinresistens og nedsatt glukosetoleranse med hyperinsulinemi. β-celle defekt i pankreas gir nedsatt insulinsekresjon og sammen med nedsatt glukosetoleranse fører dette til en tidlig form for T2D. Når alle cellene i pankreas er ødelagt, utvikles sen T2D.

1.2 Insulinresistens og skjelettmuskel

Skjelettmuskel utgjør cirka 40 % av kroppsvekten til et menneske, og står for hele 70-80 % av kroppens samlede insulinstimulerte glukoseopptak. Det er derfor skjelettmuskel er viktig ved utvikling av insulinresistens [10, 11]. Insulinstimulert glukoseopptak i fett og muskel er viktig for å redusere postprandial blodglukose (etter måltid). Dersom disse vevene ikke klarer å ta opp tilstrekkelig mengder glukose, og hepatisk produksjon og sekresjon ikke blir hemmet i respons på økende insulinivåer, er man som nevnt insulinresistent. Glukoseverdiene vil forbli høye til tross for normal insulinproduksjon [12]. Forhøyet

glukosenivå over tid kan føre til at β -cellene ødelegges [7]. Insulinresistens i skjelettmuskel er et vanlig funn hos overvektige individer og er et tidlig tegn på utvikling av T2D. De molekylære mekanismene som skjer ved insulinresistens er ikke fullstendig forstått. Fettvev spiller en sentral rolle ved insulinresistens, og forstyrrelser i fettmetabolismen med høye nivåer av sirkulerende frie fettsyrer og visse adipokiner fra adipocytene/fettvevet er vist å kunne fremkalle insulinresistens [13]. *In vivo* fosøk i overvektige individer har vist at infusjon av fettsyrer fører til utvikling av insulinresistens [14]. Forhøyet nivå av fettsyrer er assosiert med blant annet en nedgang i fosforylering av insulinreseptorsubstrat (IRS) og begrenset fosfatidylinositol 3`kinase aktivitet (PI3K) [13] (figur 1.2). Bindeleddet mellom de økte nivåene av sirkulerende frie fettsyrer og insulinresistens i muskel og lever kan involvere akkumulering av triglyserider og lipotoksiske metabolitter fra fettsyrer, som triacylglyserol (TAG), diacylglyserol (DAG), fettsyre-acyl Coenzym A (CoA) og ceramider i muskel og lever [13, 15]. I tillegg er det observert forstyrrelser i fettsyreoksidasjon og mitokondriell dysfunksjon hos individer med overvekt og hos diabetikere. Begge disse to faktorene kan føre til redusert glukosemetabolisme [16]. Insulinresistens i skjelettmuskel kjennetegnes dermed av nedsatt glukoseopptak, glykolyse og glykogensyntese, redusert lipidoksidasjon, økte nivåer av cytotoksiske lipidintermediater og mitokondriell dysfunksjon, noe som medfører redusert oksidasjon av glukose og fett.

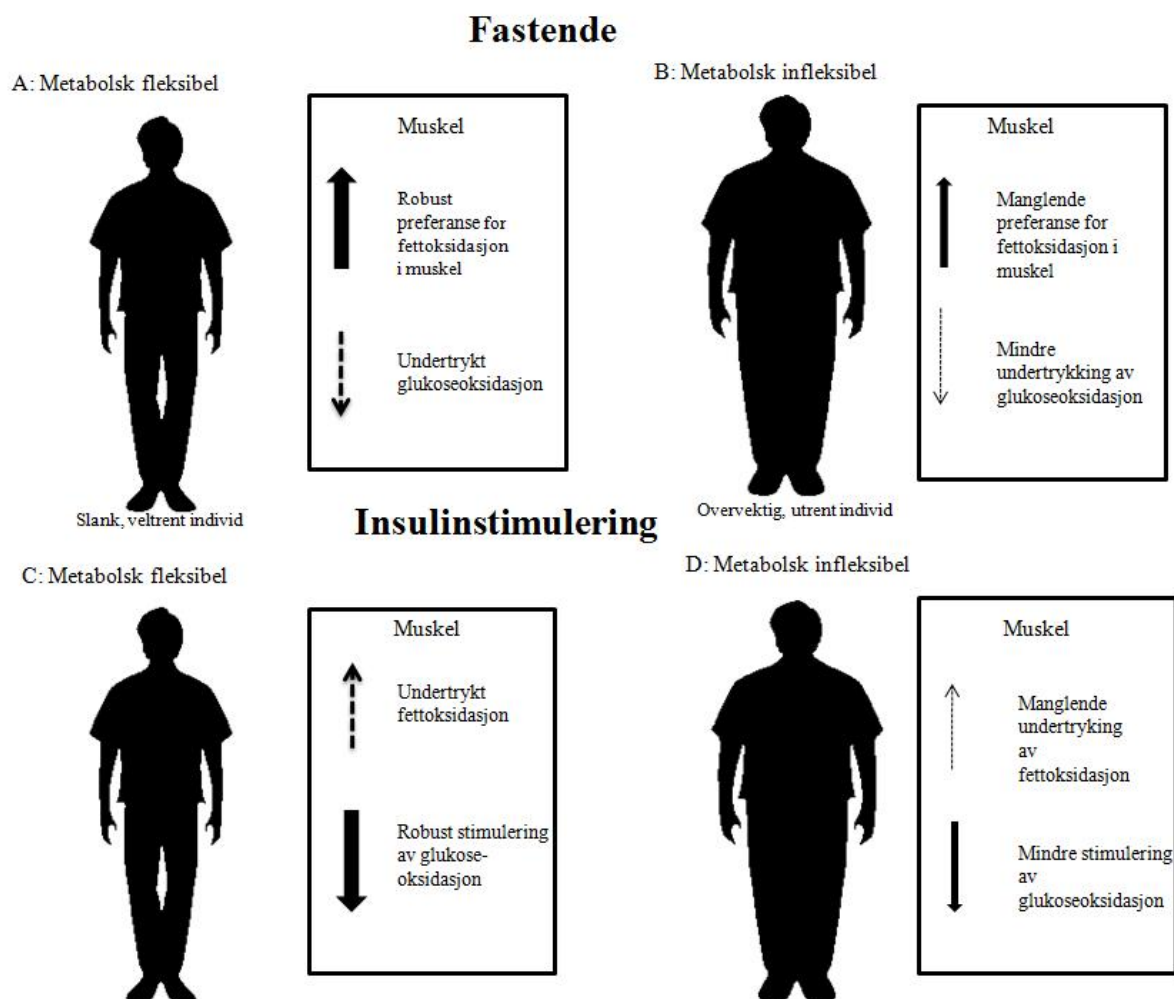


Figur 1.2 Mekanisme over fetttsyreindusert insulinresistens i skjelettmuskel. Akt: protein kinase B, DAG: diacylglycerol, FATPs: fetttsyre-transport proteiner, G6P: glukose-6-fosfat, GLUT: glukosetransportør, GS: glykogensyntase, GSK3: glykogensyntasekinase 3, IRS-1: insulinreseptorsubstrat-1, LCCoA: langkjedete acylcoenzym A, PDK: fosfatidylinositol-avhengig kinase-1, PI3K: fosfatidylinositol 3` kinase, PIP3: fosfatidylinositol-3-fosfater, PKC: proteinkinase C, pS: serin fosforylering, pS/T: serin/treonin fosforylering, Ser/thr: serin/treonin fosforylering, UDP: uridindifosfat glukose. Kilde: [17].

1.3 Metabolsk fleksibilitet

En viktig egenskap i skjelettmuskel er at den tilpasser seg to motsatte fysiologiske tilstander. Ved faste vil fettssyrer først og fremst oksideres til energi, og glukose vil forbrukes under insulinstimulering etter et måltid (postprandial fase), samtidig som fettoksidasjonen undertrykkes. Dette skiftet i energitunyttelse kalles metabolsk fleksibilitet (figur 1.3) og beregnes *in vivo* fra "Respiratorisk Quotient" ($RQ = CO_2/O_2$). Denne mekanismen ser ut til å være svekket ved T2D, insulinresistens og fedme [18, 19]. Å være metabolsk infleksibel vil dermed føre til redusert lipidoksidasjon ved faste, og glukoseoksidasjonen vil ikke øke ved insulinpåvirkning. Overgangen til en høyere fettoksidasjon er viktig for å spare plasmaglukosen ved faste og forsinke glykogennedbrytingen ved fysisk aktivitet. Den reduserte evnen til å skifte mellom oksidasjon av fett og glukose kan være relatert til akkumulering av triglyserider i skjelettmuskel. Denne akkumuleringen kan oppstå som en konsekvens av en ubalanse mellom opptak av fettssyrer og hastigheten på fettssyreoksidasjonen [20]. Metabolsk fleksibilitet kan beskrives *in vitro* ved hjelp av

adapterbarhet og suppressibilitet [21]. Adapterbarhet er evnen muskelcellene har til å øke fettsyreoksidasjonen ved tilførsel av økende konsentrasjon av fettsyre, og beskrives som ratio mellom høy og lav fettsyrekonsentrasjon [21]. Suppressibilitet betegner evnen glukose har til å undertrykke fettsyreoksidasjonen (angis som prosent suppressjon ved nærvær av en fysiologisk konsentrasjon av glukose, sammenlignet med lav eller ingen glukose) [21]. Hvordan fettsyrer og glukose gjensidig påvirker hverandres metabolisme *in vitro* i muskel er lite undersøkt. Det er vist at ved å tilsette glukose akutt til myotubene i nærvær av fettsyre hemmes fettsyreoksidasjonen (CO_2 -produksjonen) (upubliserte data, Aas *et al.*).



Figur 1.3: Metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskel. Ved faste er fettsyreoksidasjonen høy i slanke, veltrente individer (A), mens overvektige, utrente individer har mindre fettsyreoksidasjon og høyere glukoseoksidasjon (B). Insulin undertrykker fettsyreoksidasjon og induserer glukoseoksidasjon hos slanke, veltrente individer (C), mens disse responsene er redusert hos overvektige, utrente individer (D). I skjelettmuskel fra overvektige individer er det et begrenset skifte mellom fettsyre- og glukoseoksidasjon sammenlignet med energiutnyttelsen hos slanke, veltrente individer (Modifisert fra [18]).

1.4 Glukose- og fettmetabolismen i skjelettmuskel

Skjelettmuskel er et av de viktigste organene for metabolisme av glukose og lipider, sammen med lever og fettvev [22].

1.4.1 Glukosetransport

Glukosetransport inn i skjelettmuskelcellene er mediert gjennom transport ved hjelp av spesifikke transmembrane glukosetransportører (GLUT). Det finnes 13 medlemmer av GLUT-familien, men de best karakteristiske er GLUT 1-4 [12]. GLUT-1 er den hyppigst uttrykte isoformen i celler, den påvirkes ikke av insulin og medvirker til basalt glukoseopptak. GLUT-4 eksisterer kun i insulinfølsomt vev, hovedsakelig i skjelettmuskel og fettvev, og er den viktigste transportøren involvert i insulinstimulert glukoseopptak. Ved fravær av stimuli, som insulin, insulinlignende vekstfaktor, muskelkontrasjon eller hypoksi, befinner GLUT-4 seg i intracellulære vesikler [22]. Ved stimuli translokeres GLUT-4 ut til plasmamembranen ved at vesiklene fusjonerer med den (eksocytose) [13].

1.4.2 Insulinsignaler

Insulin øker glukoseopptak i muskel og fettvev og hemmer hepatisk glukoseproduksjon og -sekresjon, og er derfor en viktig regulator for glukosekonsentrasjonen i blodet [13]. Etter GLUT-4 mediert glukoseopptak i skjelettmuskelcellene kan glukosen brytes ned til pyruvat via glykolyse i cytosol. Deretter kan pyruvat metaboliseres i mitokondriene via Krebszyklus og oksidativ fosforylering til CO₂ og vann. Samtidig dannes det energi i form av adenosintrifosfat (ATP) og varme. Glukose kan også lagres i form av glykogen eller omdannes til fett ved lipogenese (figur 1.5). Insulin fremmer både glykogensyntese og glukoseoksidasjon. Når insulin binder seg til insulinreseptoren blir det sendt signaler inn i cellen via forskjellige signalveier som påvirker de ulike metabolske prosessene.

1.4.3 Insulinreseptoren

Insulinreseptoren (IR) tilhører en gruppe reseptorer som kalles tyrosinkinasereseptorer. Den er bygd opp som en tetramer bestående av to α - og to β -subenheter. Insulin bindes til α -subenheten på IR. α -subenheten hemmer tyrosinkinaseaktiviteten til β -enhetene.

Insulinbinding til α -subenheten fører til at hemmingen opphører, β -enhetene aktiveres, og det skjer en autotransfosforylering av β -enhetene. Reseptorens kinaseaktivitet katalyserer deretter fosforyleringen av en rekke substrater, deriblant insulinreseptorsubstrat (IRS) proteiner [12, 13].

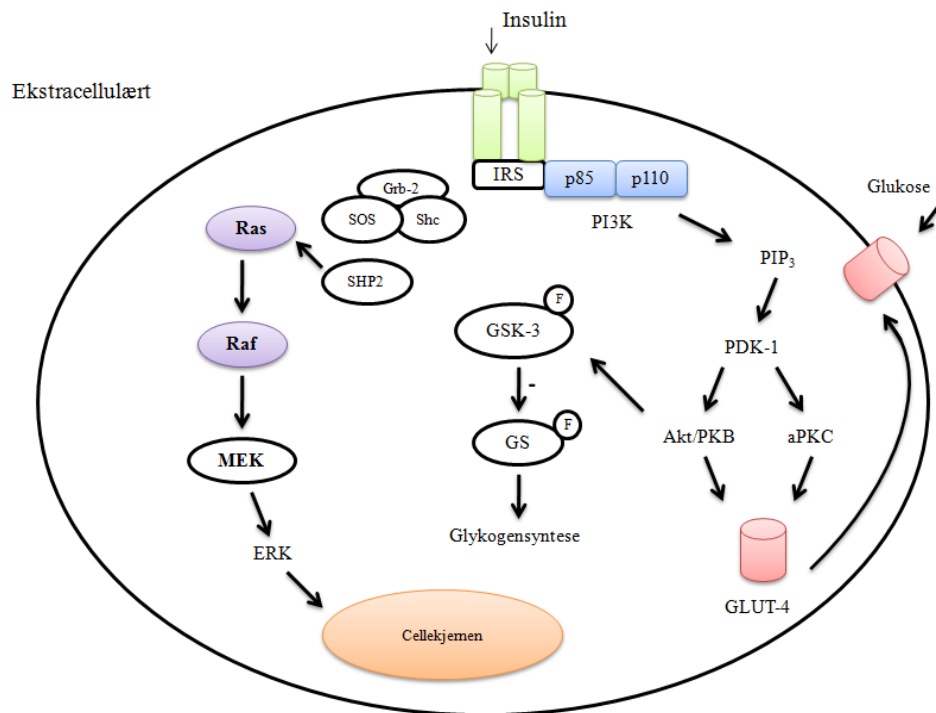
1.4.4 Insulinsignalering via type 1A fosfatidylinositol 3`kinase

IRS proteinene kan aktivere signalmolekyler med "src homology 2" (SH2) områder. Et eksempel på et slikt protein er p85, den viktigste regulatoriske enheten til type 1A fosfatidylinositol 3` kinase (PI3K). PI3K befinner seg i cytosol som en dimer bestående av en regulatorisk p85-enhet og en katalytisk p110-enhet. Når p85 bindes til et IRS protein, fraktes p110-enheten til plasmamembranen og fosforylerer fosfoinositider til fosfatidylinositol-3-fosfat (PIP_3). PIP_3 rekrutterer og aktiverer blant annet fosfoinositidavhengig kinase-1 (PDK-1). PDK-1 rekrutterer og aktiverer nedstrøms aktører som Akt og de atypiske proteinkinase C (aPKC) som er viktig for translokering av GLUT-4 ut til plasmamembranen [12].

Akt (Protein kinase B, PKB) er en insulinfølsom serin/treonin-kinase nedstrøms for PI3K. Det finnes tre Akt isoformer, hvor Akt2 er involvert i GLUT-4 translokasjon. Fosforylert Akt fremmer glukosetransport ved å stimulere translokasjon av GLUT-4 ut til plasmamembranen i insulinfølsomt vev. Aktivisering av Akt fører også til en deaktivering av glykogensyntasekinase 3 (GSK3) som dermed fører til en aktivisering av glykogensyntase (GS) og stimulering av glykogensyntese [12, 22, 23] (figur 1.4).

1.4.5 Insulinsignalering via mitogenaktivert proteinkinase

Ekstracellulær signalregulert kinase (ERK) tilhører en familie av mitogenaktivert proteinkinase (MAPK). MAPK aktiveres av blant annet insulin, og overfører ekstracellulære signaler til mange cellulære reaksjoner, som proliferasjon, differensiering, apoptose og genekspressjon. Signalkaskaden involverer det guanosintrifosfat (GTP)-bindende proteinet Ras, som setter igang en rekke aktiveringer som ender med at MAP-ERK-kinase (MEK) aktiverer ERK. Aktivert ERK vil blant annet translokeres inn i cellekjernen hvor de katalyserer fosforylering av transkripsjonsfaktorer [13] (figur 1.4).

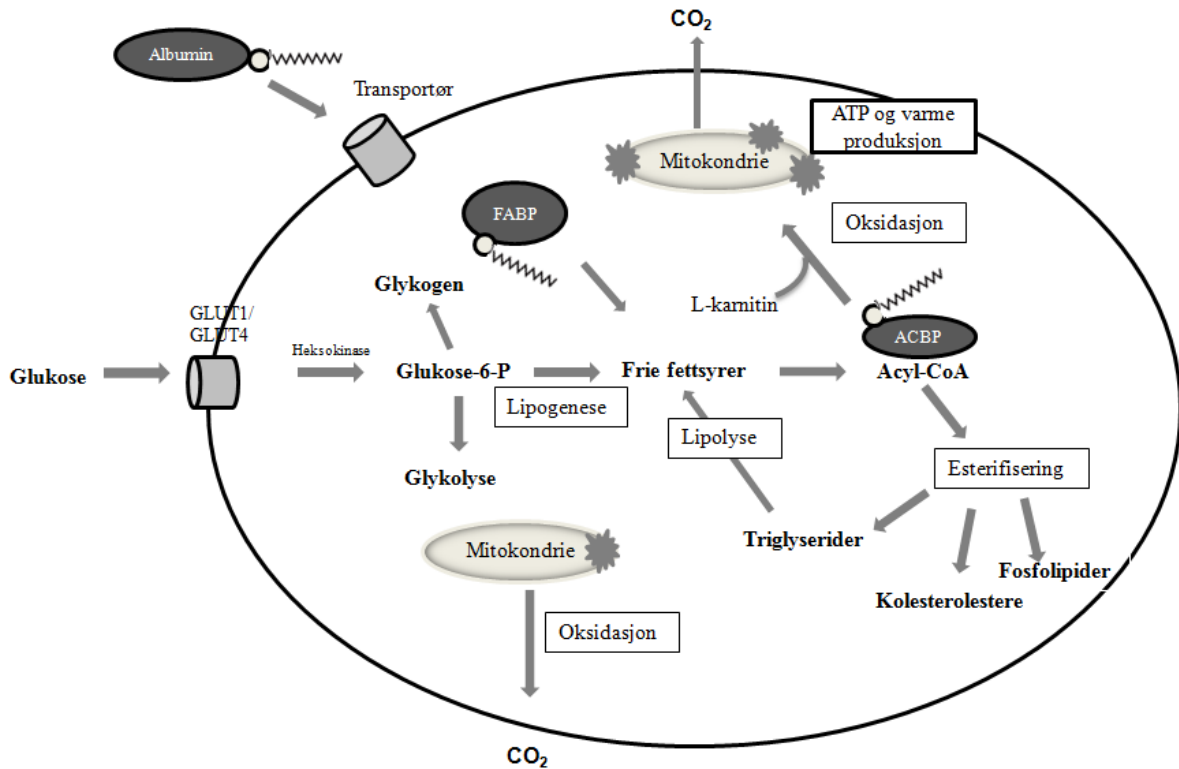


Figur 1.4 Forenklet oversikt over insulinsignalering. aPKC: atypiske proteinkinase C, ERK: ekstracellulær signalregulert kinase, GLUT: glukosetransportør, Grb-2: "growth factor receptor binding protein-2", GS: glykogensyntase, GSK-3: glykogensyntasekinase 3, IRS: insulinreseptorsubstrat, MEK: MAP-ERK-kinase, PDK-1: fosfoinositid-avhengig kinase-1: PI3K: fosfatidylinositol 3-kinase, PIP₃: fosfatidylinositol-3-fosfat, PKB: proteinkinase B, Shc: Src-homologi og kollagen homologi adapter protein, SHP2: Tyrosin fosfatase-2, SOS: "son-of-sevenless".

1.4.6 Fettmetabolismen

Langkjedete fettsyrer er en viktig energikilde for cellene. Fettsyreopptak i skjelettmuskel foregår sannsynligvis via passiv diffusjon gjennom membranen, og ved hjelp av membranassosierte proteintransportører. Tre ulike transportører er beskrevet; fettsyretranslokase (FAT/CD36), membranfettsyrebindende protein (FABP_{pm}) og fettsyretransportprotein (FATP) [24, 25]. Etter opptak av frie fettsyrer (FFA) transporteres fettsyrene intracellulært via fettsyrebindende proteiner (FABP). I cytosol blir FFA aktivert av acyl-CoA syntetaser til acyl-CoA, som kan fraktes videre via acyl-CoA bindende proteiner (ACBP) til mitokondriene. Acyl-CoA kan ikke passere den indre mitokondriemembranen. FFA må slippe taket i CoA og erstattes med L-karnitin. Derved kan fettsyrene transporteres inn i indre matriks i mitokondriene hvor FFA gir fra seg L-karnitin og binder seg til et nytt molekyl CoA [26]. I mitokondriene blir FFA oksidert via β -oksidasjon før de inngår i Krebszyklus og oksidativ fosforylering i mitokondriene. I løpet av

disse prosessene er det dannet CO_2 , vann og energi i form av ATP og varme. Alternativt kan fettsyrene fraktes til endoplasmatisk retikulum for esterifisering og lagring til forskjellige lipidklasser som TAG, DAG, fosfolipider og kolesterolistere [16] (figur 1.5). Insulin fremmer syntesen av lipider (lipogenese), og hemmer nedbrytingen av TAG (lipolyse).



Figur 1.5 Metabolisme av glukose og lipider i skjelettmuskelceller. ACBP: acyl-CoA bindende protein, FABP: fettsyrebindende protein, GLUT1/4: glukosetransportør.

1.5 Substanser som ble benyttet i preinkubering av skjelettmuskelceller

1.5.1 Palmitinsyre

Palmitinsyre er en mettet fettsyre (16:0). Forbehandling med denne fettsyren i skjelettmuskelceller har vist ugunstige effekter [16, 27]. Palmitinsyreforbehandling har vist økt fettsyreopptak, både under basal og insulinstimulerte tilstander, med økning i fosfolipid fraksjonen, og med medfølgende reduksjon i fettsyreoksidasjonen [16].

1.5.2 Oljesyre

Oljesyre er en umettet fettsyre (18:1 n-9), og kan ses på som en fettsyrekontroll. Forbehandling med oljesyre er vist å gi økt akkumulering av intracellulære lipider i humane skjelettmuskelceller [16].

1.5.3 Eikosapentaensyre

Eikosapentaensyre (EPA) er en flerumettet omega 3-fettsyre (20:5 n-3). Det er vist at kronisk eksponering av denne fettsyren gir økt glukoseopptak og glukoseoksidasjon i humane skjelettmuskelceller, til tross for økt fettsyreopptak og syntese av cellulære lipider [28].

1.5.4 Linolsyre

Linolsyre er en annen flerumettet omega 6-fettsyre (18:2 n-6). I tillegg til EPA er linolsyre en flerumettede fettsyre (PUFA) som har vist *in vivo* å bedre insulinfølsomheten i skjelettmuskel [29].

1.5.5 Tetradecyltioeddiksyre

Tetradecyltioeddiksyre (TTA) er en syntetisk fettsyreanalog med et svovelatom satt inn i karbonkjeden i tredje posisjon fra karboksylenden. På grunn av denne substitusjonen er TTA

resistent mot β -oksidasjon i mitokondriene [30]. Behandling med TTA har vist å redusere plasmalipider i dyrestudier ved å forsterke hepatisk fettsyreoksidasjon, hovedsakelig gjennom aktivering av peroksisom-proliferator-aktivert-reseptor (PPAR) [31]. Det er vist at TTA også øker total lipidoksidativ kapasitet i humane skjelettmuskelceller, samt at triglyseridlagring motvirkes (upubliserte data, Andreas Wensaas *et al.*).

1.5.6 GW501516

GW501516 (GW) er en selektiv PPAR δ agonist. GW er med på å regulere ekspresjon av gener i skjelettmuskulaturen som er involvert i økt fettsyreoksidasjon og termogenese [32, 33].

1.5.7 L-karnitin

L-karnitin er kjent for å stimulere fettsyreoksidasjonen ved å øke opptak/transport av fettsyrer i mitokondriematriks [34]. Koves *et al.* [35] viste nylig i overvektige mus at fedmerelatert insulinresistens i skjelettmuskel er forårsaket av økt β -oksidasjon, og at insulinresponsen *in vitro* i L6-rotte skjelettmuskelceller kunne gjenopprettes ved å blokkere funksjonen til L-karnitin. Lipidindusert insulinresistens ble dermed forebygget ved å hemme fettsyreopptak inn i mitokondriene [35].

1.6 Humane skjelettmuskelceller

Humane myotuber i kultur blir brukt som modell for å undersøke effekten av forbehandling med ulike fettsyrer, TTA og GW på metabolismen av glukose og fettsyrer i muskel. Myotuber som har blitt brukt er proliferert og differensiert fra satelittceller, som er udiffereensierte stamceller lokalisert utenfor muskelfibrenes vev.

1.7 Hensikt

Det er vist både *in vivo* og *in vitro* at fettsyrer kan være med å utvikle insulinresistens i muskel ved kronisk og akutt eksponering [13, 14].

Målet med denne oppgaven var å:

- studere fettsyre- og glukosemetabolismen i humane skjelettmuskelceller isolert fra friske donorer etter forbehandling med ulike fettsyrer (palmitinsyre, oljesyre, eikosapentaensyre (EPA) og linolsyre), tetradecyltioeddiksyre (TTA) og GW501516 i de siste 24 timene av cellenes differensieringsperiode, og de to sistnevnte stoffene også i de siste 4 døgnene av differensieringsperioden.
- studere myotubenes kapasitet til å regulere eksogene fettsyreoksidasjonen ved å bruke følgende *in vitro* markører for cellenes fettsyremetabolisme: adapterbarhet etter økt tilgang på fettsyre og suppressibilitet av glukose på fettsyreoksidasjonen - for derved å etablere en mulig *in vitro* modell som kan reflektere *in vivo* metabolsk fleksibilitet.
- undersøke om oksidasjonen og akkumuleringen av substrat (fettsyrer og glukose) i myotubene ble endret ved forbehandling med L-karnitin som øker fettsyreopptaket i mitokondriene.
- undersøke om noen av forbehandlingene kunne påvirke insulinsignalveien.

Disse studiene ble gjort som en del av en større undersøkelse vedrørende fettsyrer og mitokondriefunksjon i skjelettmuskelceller (fokusteam "Skeletal Muscle Insulin Resistance", "The European Nutrigenomics Organisation", NUGO). Valg av fettsyrer, konsentrasjoner og inkubasjonstid ble bestemt av initiativtakerne bak dette fokusteamet.

2. Materialer og metoder

2.1 Materialer

Dulbecco's Modified Eagle medium med Glutamax (DMEM/Glutamax-1), fungizone, føtalt kalveserum (FCS), penicillin, streptomycin og Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS m/ Ca^{2+} og Mg^{2+}) ble skaffet fra Gibco, Paisley, UK. Ekstracellulær matriks (ECM) gel, dimetylsulfoksid (DMSO), L-karnitin hydroklorid, bovint serum albumin (BSA), β -merkaptoetanol, ponceau S løsning, palmitinsyre, HEPES, D-glukose og oljesyre ble kjøpt fra Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Insulin Actrapid® Penfill® ble kjøpt fra NovoNordisk, Bagsværd, Danmark. Tetradecyltioeddiksyre (TTA) var en gave fra Rolf K. Berge, Universitet i Bergen. GW501516 ble syntetisert av Calin C. Ciocoiu, Universitetet i Oslo. Eikosapentaensyre (EPA) og linolsyre (LA) ble skaffet fra Laborel AS, Oslo. Ultrosor G ble kjøpt fra BioSeptra, Process Division of CIPHERGEN Biosystems Inc., Paris, Frankrike. Fettfri tørrmelk var en gave fra Normilk AS, Levanger, Norge. Enhanced chemiluminescence reagens (ECL) ble kjøpt fra GE Healthcare, Buckinghamshire, UK. Phospho-Akt (Ser473) og phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) ble kjøpt fra Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA. Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate, goat anti-rabbit IgG-horse raddish peroxidase conjugate, goat anti-mouse IgG-horse raddish peroxidase conjugate, 30 % Acrylamid/Bis løsning, "Tetramethylethylenediamine" (TMED) og Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards ble levert fra BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA. $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glukose (5 mCi/mmol) ble kjøpt fra American Radiolabeled Chemicals Inc., St. Louis, MO, USA. Pierce protein assay ble kjøpt fra Boule Nordic AS, Ski, Norge. OptiPhase Supermix®, $[\text{1-}^{14}\text{C}]$ oljesyre (54,6 mCi/mmol), $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ deoksyglukose (286,6 mCi/mmol) og $[\text{1-}^{14}\text{C}]$ palmitinsyre (57,5 mCi/mmol) ble levert fra PerkinElmer Life and Analytical Science, Boston, MA, USA. Kodak X-Ray fixer og Kodak X-Ray fremkaller ble kjøpt fra Carestream Health, Inc, Rochester, NY, USA.

Andre kjemikalier og reagenser som ble brukt var av analytisk kvalitet.

2.2 Donorkarakteristika

Skjelettmuskelceller brukt i dette arbeidet ble isolert fra muskelbiopsier fra *Musculus obliquus internus abdominis* (skrå, indre bukmuskel) fra 8 friske frivillige forsøkspersoner (tabell 2.1).

Tabell 2.1 Donorkarakteristika

ID	Alder (år)	Kjønn	BMI (kg/m ²)	Fastende glukose (mmol/l)
LD 15	55	Kvinne	29,1	6,9
LD 18	52	Kvinne	22,2	5,2
LD 19	65	Kvinne	23,7	6,4
LD 20	46	Kvinne	21,7	5,1
LD 22	40	Mann	28,7	5,0
LD 25	60	Kvinne	Ukjent	7,5
LD 27	44	Kvinne	21,7	5,2
LD 37	35	Kvinne	20,7	4,7
Gj.snitt ± SD	50 ± 10		24,0 ± 3,2	6,0 ± 1,0

Forkortelser:

BMI = body mass index

LD = levende donor

SD = standardavvik

2.3 Celledyrkning

De humane myotubene brukt i disse forsøkene ble dyrket i henhold til prosedyren beskrevet av Gaster *et al.* [36].

2.3.1 Utsåing av satelittceller

Lagrede fryserør med satelittceller fra ulike donorer ble tatt opp fra nitrogentanken, og tint opp i temperert vann. Cellesuspensjonen ble overført til et 50 ml sentrifugerør og 5 ml utsåingsmedium (appendiks) ble tilsatt dråpevis og blandet forsiktig. Dette ble sentrifugert ved 1800 rpm i 7 minutter. Supernatanten inneholdende cytotoxisk dimetylsulfoksid (DMSO), som bevarer cellene ved nedfrysning, ble fjernet. Cellepelletten ble resuspendert i 1 ml utsåingsmedium og blandet godt med pipette. For beregning av celletetthet ble 50 µl av cellesuspensjonen tatt ut til telling og farget med 50 µl 0,4 % tryptanblått. Deretter ble resten av suspensjonen tilsatt passende mengde utsåingsmedium og blandet godt, og cellene ble

sådd ut på ferdigcoatede CellBind 3300 96-brønnersbrett. Det ble sådd ut 100 µl per brønn og dette tilsvarte en celletetthet på cirka 6000 celler per brønn.

2.3.2 Vekst av satelittceller og differensiering til myotuber

Etter utsåing ble satelittcellene inkubert i 24 timer ved 37°C og 5 % CO₂. Utsåingsmedium ble skiftet til proliferasjonsmedium (appendiks), 100 µl per brønn, og cellene ble inkubert i 2 dager til før ytterligere 100 µl proliferasjonsmedium ble tilsatt. Dette ble gjort i stedet for å bytte medium, for å forstyrre cellene minst mulig. Proliferasjonsmedium ble skiftet hver 2.-3. dag til cellene nådde 70-80 % konfluens eller begynte å spontandifferensiere. På dette tidspunktet ble vekstmedium byttet ut med differensieringsmedium (appendiks). Cellene startet dermed å differensiere til flerkjernede muskelfibre (myotuber). Differensieringsmedium ble skiftet cirka hver 2. dag. Forsøkene ble utført på dag 7 etter start av differensieringen. Ulike substanser ble tilsatt cellene sammen med differensieringsmediet de siste 4 døgn (fra dag 3 etter start av differensiering) eller 24 timer (fra dag 6 etter start av differensiering) av differensieringen. Fettsyrefri kontroll i forsøkene var enten bovint serum albumin (BSA) eller dimetylsulfoksid (DMSO). Cellene ble visuelt undersøkt i mikroskop i løpet av proliferasjons- og differensieringsperioden, og enkelte ganger ble det tatt bilder for å dokumentere utseende og vekst. I alle forsøkene ble det brukt 4 brønner per behandling.

2.4 “Multiwell fuel handling”

2.4.1 Prinsipp

”Multiwell fuel handling” er en metode for å måle opptak og oksidasjon av ¹⁴C-merkede substrater (¹⁴C-fettsyrer eller ¹⁴C-glukose) i humane skjelettmuskelceller. Ved substrat-oksidasjonsforsøk kvantifiseres oksidasjon av radioaktive substanser ved å måle mengden ¹⁴CO₂ produsert. CO₂-produksjonen fanges kontinuerlig opp i ei filterplate, som ligger over celleplata, ved at CO₂ reagerer med den basiske løsningen (NaOH) i filterplata. Mengden radioaktivitet akkumulert i cellene kan også måles. ”Scintillation proximity assay” (SPA) er en annen ”multiwell” metode som kan måle akkumulering av radioaktiv merkede substanser fortløpende og ved ulike tidspunkter uten at cellene må høstes og lyseres [37].

2.4.2 Substrat-oksidasjonsforsøk med radioaktiv fettsyre

På forsøksdagen ble differensieringsmedium byttet til forsøksmedium, bestående av DPBS tilsatt 10 mM HEPES (pH 7,3), 1 mM L-karnitin, ikke-radioaktiv oljesyre/palmitinsyre, radioaktivt fettsyre og BSA i forholdet 1:2,5. Følgende radioaktive fettsyrer og konsentrasjoner ble brukt:

- $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 18,3 μM)
- $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (0,273 $\mu\text{Ci/ml}$, 5 μM)
- $[1-^{14}\text{C}]$ palmitinsyre (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 17,4 μM)

Den endelige fettsyrekonsentrasjonen i forsøksmediet var på 5 μM eller 100 μM .

Forsøkene ble utført med og uten nærvær av glukose (5 mM). 50 μl forsøksmedium ble tilsatt hver brønn, og 96-brønnersbrettet ble plassert i ei platepresse (trapper). En 96-brønners filterplate ble tilsatt 1 M NaOH, 20 μl per filterbrønn, og plassert oppå 96-brønnersbrettet med celler, med en 96-hulls silikonpakning mellom. Tilslutt ble det lagt på en metallplate for å legge et jevnt press på platene og for å få et lufttett system. Cellebrettet i trapperen ble inkubert ved 37°C i 4 timer. Etter inkuberingen ble forsøksmediet fjernet, og myotubene ble vasket forsiktig 2 ganger med 150 μl høstebuffer (PBS-buffer, pH 7,4) per brønn.

Måling av fettsyreoksidasjon (dannelse av karbondioksid)

De radioaktive fettsyrene som blir tatt opp i cellene blir metabolisert til CO_2 i mitokondriene (Krebssyklus). Mengden av $[^{14}\text{C}]$ fettsyre som metaboliseres i cellene er relatert til mengden $[^{14}\text{C}]\text{CO}_2$ som dannes.

Etter 4 timers inkubering ble 96-brønnersfilterplaten tatt av og tilsatt 40 μl Optiphas Supermix® tellvæske i hver brønn. Radioaktiviteten i prøvene ble målt ved hjelp av β -scintillasjonstelleren (1450 Microbeta PLUS®) fra Wallac etter henstand i 2 døgn.

Måling av celleassosiert fettsyre

Celleassosiert [^{14}C]fettsyre er et mål på cellenes fettsyreopptak (akkumulering) etter endt inkubasjon. I realiteten er opptaket høyere, fordi en del av [^{14}C]fettsyren har blitt oksidert til [^{14}C]CO₂ og β -oksidasjonsprodukter fra lipidmetabolismen vil gjenfinnes i forsøksmediet.

Etter vaskingen av myotubene som nevnt ovenfor, ble 200 μl 0,1 M NaOH tilsatt hver brønn og platen ble frosset ned (-20°C). For å måle radioaktiviteten i prøvene, ble 50 μl homogenisert cellelysate fra hver brønn overført til et 96-brønnersbrett (Isostar) og 100 μl Optiphas Supermix® tellvæske tilsatt. Radioaktiviteten i prøvene ble telt i β -scintillasjonstelleren for mikroplater (1450 Microbeta PLUS®).

2.4.3 Substrat-oksidasjonsforsøk med radioaktiv glukose

Differensieringsmedium ble skiftet til forsøksmedium bestående av DPBS tilsatt 10 mM HEPES-buffer (pH 7,3) og følgende radioaktiv glukose:

- [U- ^{14}C]glukose (0,5 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM)

Den endelige glukosekonsentrasjonen i forsøksmediet var på 100 μM .

Forsøkene ble utført med og uten insulin (100 nM). 50 μl forsøksmedium ble tilsatt hver brønn, og 96-brønnersbrettet ble plassert i ei platepresse (trapper). En 96-brønners filterplate ble tilsatt 1 M NaOH, 20 μl per filterbrønn, og plassert oppå 96-brønnersbrettet med celler, med en 96-hulls silikonpakning mellom. Tilslutt ble det lagt på en metallplate for å legge et jevnt press på platene og for å få et lufttett system. Trapperen ble inkubert ved 37°C i 4 timer. Etter inkuberingen ble forsøksmediet fjernet, og myotubene ble forsiktig vasket 2 ganger med 150 μl høstebuffer (PBS-buffer, pH 7,4) per brønn.

Måling av glukoseoksidasjon (dannelse av karbondioksid)

Den radioaktive glukosen som blir tatt opp i cellene blir metabolisert til CO₂ i mitokondriene (Krebszyklus). Mengden av [^{14}C]glukose som metaboliseres er relatert til mengden [^{14}C]CO₂ som dannes.

Etter 4 timers inkubering ble 96-brønnersfilterplaten tatt av og tilsatt 40 µl Optiphase Supermix® tellervæske i hver brønn. Radioaktiviteten i prøvene ble målt ved hjelp av β-scintillasjonstelleren (1450 Microbeta PLUS®) etter 2 døgns henstand.

Celleassosiert glukose

Celleassosiert [¹⁴C]glukose er et mål på cellenes glukoseopptak (akkumulert glukose) etter endt forsøk. I realiteten er opptaket høyere, fordi en del av [¹⁴C]glukose har blitt oksidert til [¹⁴C]CO₂ i Krebszyklus i tillegg til laktatdannelse ved anaerob metabolisme i cytosol (under glykolysen).

Etter vaskingen av myotubene som nevnt ovenfor, ble 200 µl 0,1 M NaOH tilsatt hver brønn og platen frosset ned (-20°C). For å måle radioaktiviteten i prøvene, ble 50 µl homogenisert cellelysat fra hver brønn overført til et 96-brønnersbrett (Isostar) og 100 µl Optiphase Supermix® tellervæske tilsatt. Radioaktiviteten i prøvene ble telt i en β-scintillasjonsteller (1450 Microbeta PLUS®).

2.4.4 “Scintillation proximity assay” (SPA)

Ved hjelp av ”scintillation proximity assay” (SPA) kan akkumulering av radioaktivt merkede substrater måles fortløpende og ved ulike tidspunkter uten at cellene må høstes og lyseres. Radioaktivt merkede substrater blir tatt opp og akkumulert av cellene. Denne radioaktiviteten vil bli konsentrert nært scintillatoren som er inkorporert i bunnen av brettet som cellene dyrkes på, og danner et sterkere signal enn radioaktiviteten som befinner seg ute i cellemediet. Man kan måle transport av radioaktivitet inn i cellene (økt intensitet av signal) og transport ut cellene (reduert intensitet av signal) [37].

Skjelettmuskelceller ble sådd ut på 96 brønners Cytostar-T™ SPA brett. Etter 7 dagers differensiering, ble differensieringsmedium skiftet til forsøksmedium, bestående av [U-¹⁴C]deoksyglukose (1 µCi/ml, 3,49 µM), ikke-radioaktiv glukose og fargeløst differensieringsmedium (appendiks). Den samlede konsentrasjonen av deoksyglukose og glukose var på 100 µM. Forsøket ble utført med og uten nærvær av insulin (100 nM). 50 µl forsøksmedium ble tilsatt hver brønn. Brettet ble deretter satt inn i β-scintillasjonstelleren (1450 Microbeta PLUS®) for første telling (null prøve og korrigering av bakgrunn). Hver brønn ble telt i 30 sekunder. Deretter ble brettet satt inn i inkubatoren (37°C, 5 % CO₂).

Brettet ble telt igjen etter 1, 2, 4, 6, 8 og 10 timer. Mellom hver telling sto brettet i inkubatoren. Etter forsøket ble forsøksmediet fjernet og cellene ble vasket 2 ganger med 150 μ l høstebuffer (PBS-buffer, pH 7,4) per brønn. 200 μ l 0,1 M NaOH ble til slutt tilsatt i hver brønn og celleplaten ble frosset ned (-20°C).

2.4.5 Proteinmåling

Til proteinmåling benyttes Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate. Proteinmåling med dette reagenset er basert på Bradford dye-binding metoden [38]. Dette er en spektrofotometrisk prosedyre for å måle proteinkonsentrasjonen i en løsning, som baseres på at fargen Coomassie Brilliant Blå G-250 skifter farge når den primært bindes til basiske og aromatiske aminosyrer i et surt miljø. Fargen endres fra rød til blå når den bindes til proteiner og absorpsjonsmaksimum endres fra 465 til 595 nm. Blåfargen absorberer UV ved 595 nm.

Det ble overført 50 μ l homogenisert cellelysat fra hver prøve og 2×50 μ l av proteinstandarder til et mikrotiterplate (96-brønnersbrett). Proteinstandardene ble laget fra BSA og fortynnet i 0,1 M NaOH til kjente konsentrasjoner (0-140 $\mu\text{g/ml}$). Til hver brønn ble det tilsatt 200 μ l fortynnet proteinfargningsreagens. Denne ble laget ved å fortynne 1 del fargekonsentrat (BioRad) med 4 deler destillert vann. Prøvene sto i romtemperatur i 5 minutter før absorbansen ved 595 nm ble målt ved hjelp av Wallac VictorTM mikroplateleser fra Perkin Elmer. Ved hjelp av standardkurven ble proteinkonsentrasjonen i prøvene beregnet.

2.4.6 Lipidfiltrasjon

Etter endt inkubasjon med radioaktiv fettsyre var det også mulig å undersøke hvor mye av den radioaktive fettsyren som hadde blitt lagret som triglyserider, kolesterolistere, fosfolipider (komplekse lipider) og frie fettsyrer i cellene. Dette ble gjort ved hjelp av lipidfiltrering, hvor lipider binder seg til en 0,45 μM hydrofob membran.

Filtrene på MultiScreen 96-brønnersbrettet ble fuktet og aktivert med 50 μ l 70 % etanol. Etter 30 sekunder ble etanolen filtrert gjennom filteret ved hjelp av en Millipor vakumstasjon. Deretter ble filtrene vasket med 2×200 μ l dH_2O . Overflødig vann ble fjernet.

50 µl homogenisert cellelysate fra hver brønn ble tilsatt filterbrønnene og filtrert gjennom vha. vakumstasjonen. Filtrene ble deretter vasket med 6 x 600 µl dH₂O. Overflødig vann ble tørket bort og plastcoveret fra undersiden ble fjernet. Ett nytt gjennomsiktig plastcover ble satt på undersiden. 100 µl Optiphase Supermix[®] tellervæske ble tilsatt i hver brønn og radioaktiviteten ble målt i β-scintillasjonstelleren (1450 Microbeta PLUS[®]).

2.5 Westernblotting

2.5.1 Prinsipp

Westernblotting er en molekylærbiologisk metode som anvendes for å oppdage og kvantifisere spesifikke proteiner. Det benyttes gelelektroforese i en polyakrylamidgel for å separere denaturerte, ladde proteiner etter masse i et elektrisk felt. Proteinene overføres til en membran og det tilsettes et antistoff mot det proteinet man ønsker å analysere. Deretter tilsettes et sekundært antistoff som bindes til det primære antistoffet. Det sekundære antistoffet er konjugert til enzymet "Horseradish Peroxidase" (HRP) som sammen med et substrat danner en fluorescerende reaksjon.

2.5.2 Utsåing av satelittceller

Utsåing av satelittceller til Westernblotting ble gjort etter den samme prosedyren som nevnt i 2.3, men cellene ble sådd ut og dyrket på 21 cm² Corning-skåler. Disse skålene ble på forhånd coatet med ekstracellulært matriks (ECM)-gel slik at cellene kunne feste seg til bunnen. Dette ble gjort ved at ECM-gel ble fortynnet i DMEM m/Glutamax-1 i forholdet 1:75. Den fortynnete ECM-blandingen ble tilsatt hver skål for deretter å bli sugd opp igjen ved hjelp av en pipette. ECM dannet en tynn film på bunnen av skålene. Da dette ble tørt, ble 2 ml celsuspensjon sådd ut på skålene. Dette tilsvarte en celletetthet på cirka 4000 celler/cm².

2.5.3 Forbehandling og høsting av myotuber

Etter 7 dager differensiering og forbehandling med ulike substanser ble myotubene preinkubert i 15 minutter med insulin (100 nM) eller dH₂O. Årsaken til at dH₂O ble tilsatt

var at forholdene for myotubene skulle være mest mulig like. Stimuleringen ble stoppet ved å helle av mediet, skylle to ganger med PBS og tilsette 200 µl 2x sampelbuffer (appendiks). Innholdet i skålene ble deretter skrapet, overført til små rør som tåler koking og satt på is. Deretter ble rørene kokt på vannbad (100°C) i 5 minutter. 25 µl av prøvene ble tatt av til proteinmåling før β-merkaptoetanol og bromfenolblått (appendiks), henholdsvis 10 % og 5 % ble tilsatt (Laemmlibuffer, appendiks). Prøvene ble kokt ytterligere i 5 minutter før de ble frosset ned (-20°C). Sammen med kokingen, denaturerer SDS (fra samplebufferen) proteinene og legger seg rundt proteinene med negativ ladning. Proteinene får derved en total negativt ladning. Disse kompleksene vil under elektroforesen bli separert i forhold til molekylvekt. β-merkaptoetanol bryter opp disulfidbindingene (S-S bindingene), som er med på å danne proteinenes flerdimensjonale struktur, og hindrer nydannelse av disulfidbroer.

2.5.4 Proteinmåling

5 µl prøve ble tilsatt 30 µl dH₂O og 700 µl reagens. Reagenset kom fra Pierce BCA protein assay reagent, og ble laget ved å blande 50 deler A (Bicinchoninic acid) og 1 del B (4 % CoSO₄). Prøvene ble satt på varmeblokk (60°C) i 30 minutter. Deretter ble prøvene avkjølt og fordelt i mikrotiterplate, 300 µl med 2 paralleller på hver prøve. Standardkurven ble lagd ved å fortynne BSA 0,5 mg/ml i samplebuffer som var fortynnet 1:3,5 i dH₂O. Proteinmengden ble beregnet ved å måle absorbansen ved 590 nm på Wallac VictorTM mikroplateleser fra Perkin Elmer.

2.5.5 Gel-elektroforese

Proteinene fra prøvene ble separert i forhold til molekylvekt ved bruk av gel-elektroforese. Det ble støpt en 12 % polyakrylamidgel (appendiks) og 200 µl isobutanol ble tilsatt på toppen. Hensikten med å tilsette isobutanol var å få en flat gel-overflate og forhindre luft i å bremse polymeriseringsprosessen. Gelen ble polymerisert i cirka 45 minutter før isobutanol ble fjernet og gelene ble vasket med dH₂O. 4 % stackgel (appendiks) ble deretter tilsatt støpeformen til den ble full, og brønnkammer ble satt på plass før stackgelen ble polymerisert i cirka 45 minutter. Etter platene ble tatt fra hverandre og vasket med dH₂O, var gelen klar til bruk. Gelen ble festet i elektroforesekaret og karet ble fylt opp med elektroforesebuffer (appendiks). Det ble tilsatt utregnede mengde prøve i brønnene, slik at det ble lik mengde protein i hver brønn (14 µg protein). 2,5 µl standard (Bio-Rad Precision

Plus Protein Dual Color Standards) ble tilsatt i en brønn på hver gel. Denne standarden inneholder ulike proteiner med kjent molekylvekt, slik at man kan sammenligne proteinprøvene mot en kjent standard. Elektroforesen ble kjørt på 200 V i 80 minutter.

2.5.6 Blotting

Etter elektroforesen ble proteinene i gelen blottet over til nitrocellulosemembran (HybondTM-ECLTM) ved semitørr-blotting i TE 70 ECL Semi-dry Transfer Unit fra Amersham Biosciences ved 32 mA (per gel) i 60 minutter. Dette for å gjøre proteinene tilgjengelig for deteksjon av antistoff.

2.5.7 Deteksjon og kvantifisering

Membranen ble lagt i Blotto (appendiks) på vippebrett i 60 minutter ved romtemperatur. Tørrmelken i Blotto inneholder proteiner som vil feste seg til membranen, og dermed blokkere for uspesifikk binding av antistoff til membranen. Deretter ble løsningen vasket av og primært antistoff fortynnet i Blotto ble tilsatt. Dette ble inkubert over natten på kjølerom med vipping og deretter vasket av. Det ble så tilsatt et overskudd av peroksydasemerket sekundært antistoff fortynnet i Blotto, og det ble inkubert i 60 minutter før dette også ble vasket av med T-TBS (appendiks). Membranen ble inkubert 1 minutt i "enhanced chemiluminescence" reagens (ECL), som ble gjort istand like før inkuberingen. Etter inkubasjonen ble membranen pakket inn i plastfolie, overført til en filmkassett og eksponert i 1 minutt. Prinsippet for ECL er at det sendes ut energi i form av lys som et resultat av en kjemisk reaksjon mellom HRP og ECL. Lyset detekteres på filmen. Kvantifisering ble gjort ved hjelp av GeneTools from SynGene. Blottene ble skannet inn, og relativ lysintensitet til de ulike båndene på blottet ble målt.

Se appendiks for mer utfyllende metodebeskrivelse.

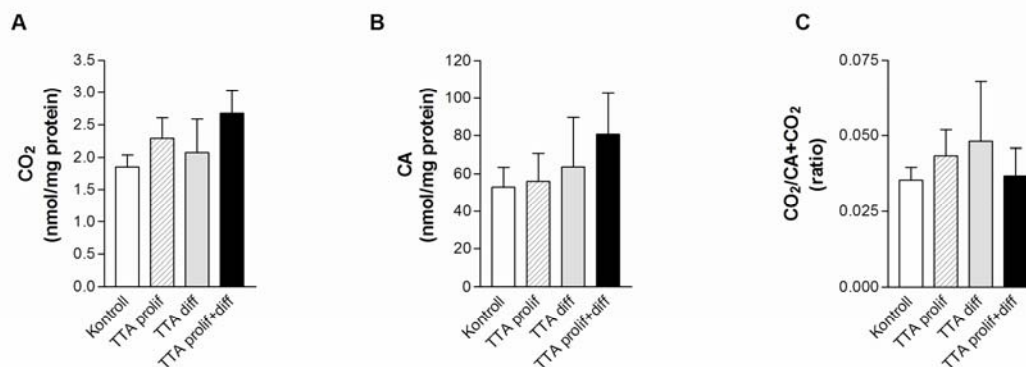
2.6 Statistisk analyse

Alle verdier er presentert som middelveier (gjennomsnitt) \pm SEM. n representerer antall individuelle forsøk som er utført. For hvert forsøk ble middelveier regnet ut fra fire paralleller for hver behandling. Statistisk analyse ble utført med SPSS, linear mixed model. Denne metoden ble brukt for å sammenligne ulike celledonorer og behandlinger ved parvis sammenligning mellom donorer som ble inkubert under de samme forsøksbetingelser. $p \leq 0,05$ ble ansett som statistisk signifikant.

3. Resultater

3.1 Forbehandling med TTA i proliferasjonsperioden, differensieringsperioden eller begge perioder

Det var ønskelig å undersøke om det var mulig å endre på musklens oksidative egenskaper (f.eks. økt lipidoksidasjon) ved å tilsette TTA (en PPARagonist) under proliferasjonen av skjelettmuskelcellene, under differensieringen eller under både proliferasjonen og differensieringen av cellene (figur 3.1). Tilsetning av TTA under proliferasjonsperioden, differensieringsperioden eller begge perioder ga ikke noen tydelig økning i hverken CO₂-produksjonen eller på opptak av radioaktiv oljesyre (100 µM) sammenlignet med kontrollbehandling (standard proliferasjonsmedium og differensieringsmedium uten tilsetning av TTA) (figur 3.1). Dette gjaldt også for myotuber som var blitt forbehandlet med 24-timerssubstanter (palmitinsyre, TTA eller GW (data ikke vist). Ut fra disse resultatene etter forbehandling med TTA, ble det bestemt å fortsette med standard dyrkningsbetingelser uten TTA (avsnitt 2.3).



Figur 3.1 Effekter av å tilsette TTA under proliferasjonen av skjelettmuskelcellene, under differensieringsperioden eller begge perioder på oksidasjon av oljesyre til CO₂ (A), celleassosiert (CA) oljesyre (B) og forholdet mellom CO₂ og CA+CO₂ (C). Muskelcellene ble tilsatt 25 µl TTA under proliferasjonen. Under differensieringen ble det tilsatt 100 µM TTA på differensieringsdag 4-6. Med TTA i begge perioder, ble det tilsatt samme konsentrasjon og på samme tidspunkt som nevnt ovenfor, men da i begge perioder. Eksperimentet ble utført på differensieringsdag 7 ved å inkubere myotubene i 4 timer med [1-¹⁴C]oljesyre (1 µCi/ml, 100 µM). Data ble illustrert som gjennomsnitt ± SEM (n=3 à 4 paralleller).

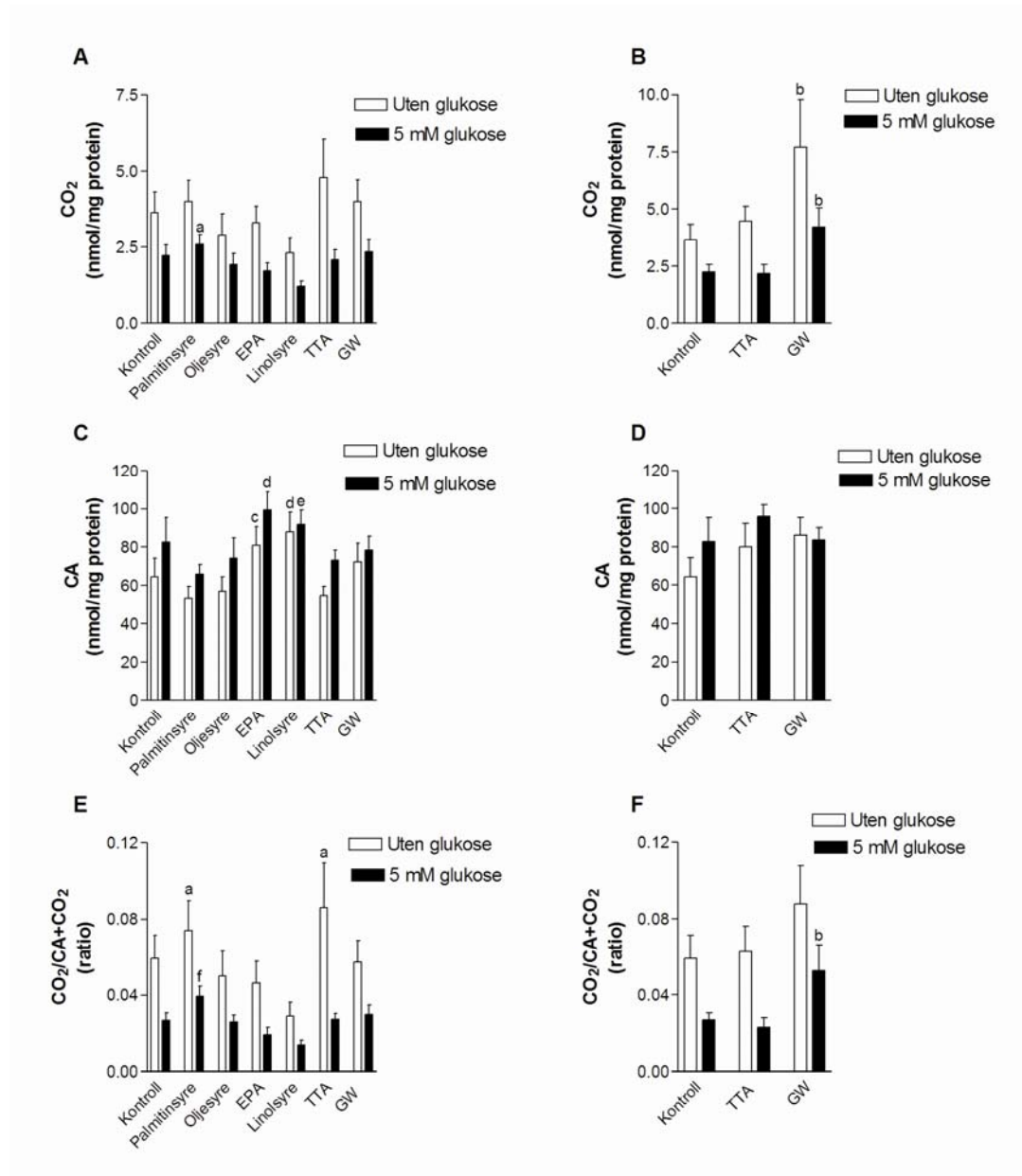
3.2 Effekter av forbehandling med ulike fettsyrer, TTA, GW501516 og akutt tilsetning av glukose på oljesyremetabolismen

Videre var det ønskelig å undersøke hvordan 24 timer eller 4 døgns preinkubering med ulike fettsyrer, TTA eller GW påvirket den akutte oljesyreoksidasjonen, samt hvordan akutt glukosetilsetning (5 mM) påvirket oljesyremetabolismen etter samme forbehandlingssubstanser og inkubasjonstid (figur 3.2). Akutt oksidasjon av radioaktiv oljesyre (100 μ M) etter 24 timers forbehandling med ulike fettsyrer, var uendret eller viste tendens til redusert oksidasjon sammenlignet med fettsyrefri kontroll (figur 3.2A). Da myotubene ble tilsatt forsøksmedium med 5 mM glukose, ble oksidasjonen av radioaktiv oljesyre betydelig redusert sammenlignet med 0 mM glukose (figur 3.2A og B). Den gjennomsnittlige glukosehemmingen av fettsyreoksidasjonen var på 44,7 % ($p=0,0001$). Ved tilstedeværelse av glukose etter forbehandling med palmitinsyre i 24 timer, var CO₂-produksjonen signifikant 2 ganger høyere i forhold til 24 timers behandling med linolsyre. For de andre fettsyrene, TTA og GW var det ingen signifikante forskjeller, heller ikke ved fravær av glukose i forsøksmediet (figur 3.2A). Forbehandling i 24 timer med TTA viste høyest oksidasjon uten tilstedeværelse av glukose (figur 3.2A). Etter 4 døgns preinkubering viste forbehandling med GW høyest oksidasjon både med og uten glukose i forsøksmediet. Forbehandling med GW førte til at CO₂ produksjonen var 1,7 til 2 ganger høyere i forhold til både kontroll og TTA med og uten tilstedeværelse av glukose (figur 3.2B).

Oljesyreopptaket i myotubene økte da glukose var tilstede i forsøksmediet etter alle forbehandlingene, unntatt etter preinkubering med GW i 4 dager (figur 3.2C og D). Glukoseøkningen var gjennomsnittlig på 17% ($p=0,007$). Forbehandling med EPA, ved tilstedeværelse av glukose, ga høyest opptak av radioaktiv oljesyre sammenlignet med de andre behandlingene. Linolsyreforbehandling ga også et høyt opptak av oljesyre (figur 3.2C). Det var ingen signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingene etter 4 døgns preinkubering (figur 3.2D).

Ratio CO₂/CA+CO₂ (dvs. fraksjon av radioaktiv oljesyre som har blitt tatt opp av myotubene og blitt oksidert til CO₂) ble tydelig redusert ved eksponering for glukose, med en gjennomsnittlig hemming på 52,5 % ($p=0,0001$) for alle behandlingene (figur 3.2E og F). Forbehandling i 24 timer med TTA, uten glukose i forsøksmediet, førte til at fraksjonell

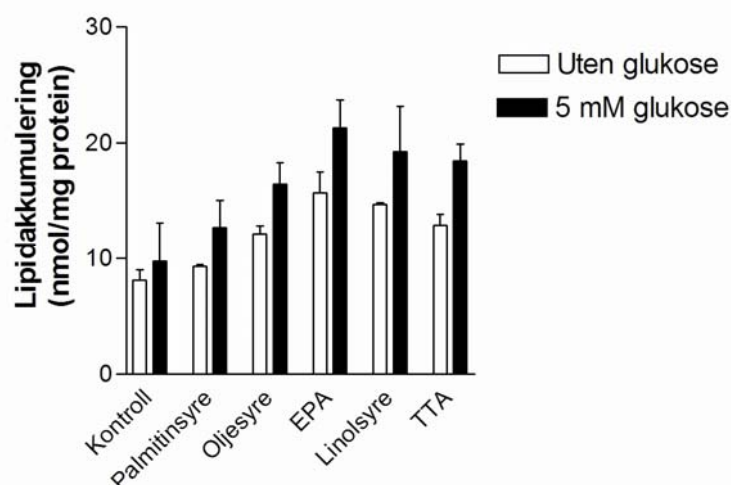
oksidasjon var signifikant 3 ganger høyere i forhold til linolsyre (figur 3.2E). Fraksjonell oksidasjon etter preinkubering med GW i 4 døgn med akutt glukose tilsatt i mediet var signifikant økt sammenlignet med kontroll og 4 dager med TTA (figur 3.2F)



Figur 3.2 Oksidasjon av oljesyre (OA) til CO₂ (A, B), celleassosiert (CA) oljesyre (C, D) og forholdet mellom CO₂ og CA+CO₂ (E, F) etter forbehandling med enten kontroll, palmitinsyre (100 µM), oljesyre (100 µM), EPA (100 µM), linolsyre (100 µM), TTA (100 µM) eller GW (10 nM) de siste 24 timene (A, C, E) eller de siste 4 døgnene (B, D, F) av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere myotubene i 4 timer med [¹⁻¹⁴C]OA (1 µCi/ml, 100 µM) med eller uten 5 mM glukose i forsøksmediet. Data ble illustrert som gjennomsnitt ± SEM (n=7 à 4 paralleller).

a: $p \leq 0,05$ mot linolsyre, b: $p \leq 0,05$ mot kontroll og TTA, c: $p \leq 0,05$ mot palmitinsyre og TTA, d: $p \leq 0,05$ mot TTA, oljesyre og palmitinsyre, e: $p \leq 0,05$ mot palmitinsyre, f: $p \leq$ EPA og linolsyre.

Etter endt forsøk med 100 μM radioaktiv oljesyre med ulike forbehandlinger ønsket man å se på akkumulering av radioaktive lipider ved å benytte en lipidfiltreringsteknikk. På denne måten kunne man finne ut hvor mye av oljesyren som ble gjenfunnet som celleassosierte lipider (fri oljesyre, samt inkorporert i triglyserider, kolesterollestere og fosfolipider) (figur 3.3). Ved tilstedeværelse av glukose (5 mM) økte lipidakkumuleringen for alle forhandlingene. Økningen i lipider ved tilstedeværelse av glukose var gjennomsnittlig på 34 % ($p=0,001$). Størst respons på lipidakkumuleringen var det etter 24 timers forbehandling med EPA, både med og uten glukose tilsatt i forsøksmediet.



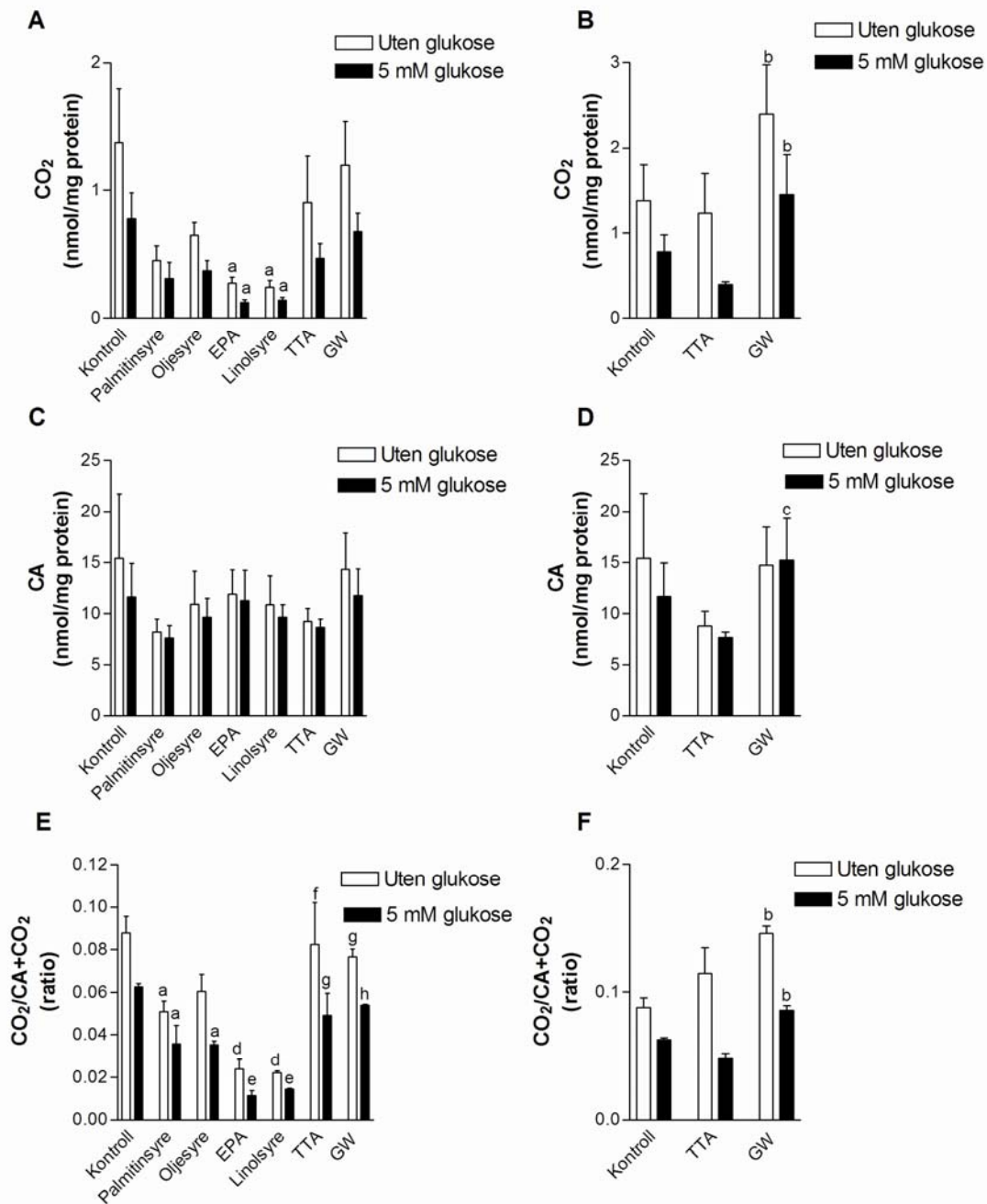
Figur 3.3 Lipidakkumulering etter forbehandling med enten kontroll, palmitinsyre (100 μM), oljesyre (100 μM), EPA (100 μM), linolsyre (100 μM) eller TTA (100 μM) de siste 24 timene av differensieringsperioden. Eksperimentet ble utført ved å inkubere myotubene i 4 timer med [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM) med eller uten 5 mM glukose i forsøksmediet. Deretter ble cellelysatet filtrert gjennom et MultiScreen-brett. Data ble illustrert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=2$ à 4 paralleller).

For å beregne metabolske parametere var det også nødvendig å undersøke oljesyremetabolismen ved en lav fettsyrekonsentrasjon, 5 μM oljesyre. Figur 3.4 viser hvordan oljesyremetabolismen ble påvirket ved tilsetning av 5 mM glukose etter forbehandling med fettsyrer, TTA og GW i 24 timer og de to sistnevnte i 4 døgner. Oksidasjonen av radioaktiv oljesyre (5 μM) ble redusert ved tilsetning av forsøksmedium med 5 mM glukose sammenlignet med 0 mM glukose. Glukosehemmingen av fettsyreoksidasjonen var på gjennomsnittlig 46 % ($p=0,017$). Oksidasjonen av 5 μM oljesyre viste tilnærmet likt mønster sammenlignet med radioaktiv oljesyre på 100 μM . Kontroll og myotuber forbehandlet med GW viste høyest respons på oksidasjonen av 5 μM oljesyre etter

24 timers behandling, og celler behandlet med GW viste høyest respons etter 4 døgns preinkubering (figur 3.4A og B)

Det ble ikke observert en signifikant glukoseeffekt på oljesyreopptaket i myotubene (figur 3.4C og D). Opptaket økte ikke ved tilstedeværelse av glukose (5 mM) slik det ble observert ved 100 μ M oljesyre. Forbehandling med TTA i 4 døgn viste lavest respons på oljesyreopptaket sammenlignet med kontroll og forbehandling med GW (figur 3.4D). Dette gjaldt både med og uten tilstedeværelse av glukose i forsøksmediet.

Ratio $\text{CO}_2/\text{CA}+\text{CO}_2$ (fraksjonell oksidasjon) ble også redusert ved eksponering for glukose i forsøksmediet med en gjennomsnittlig 40 % hemning ($p=0,002\%$) for alle behandlingene (figur 3.4E og F). Forbehandling med fettsyrer reduserte fraksjonell oksidasjon i forhold til kontroll. Preinkubering med TTA i 24 timer uten glukose i forsøksmediet førte til at fraksjonell oksidasjon var signifikant høyere sammenlignet med forbehandling med palmitinsyre, linolsyre og EPA. Etter 4 døgns preinkubering med GW, viste ratioen seg å være signifikant høyere sammenlignet med kontroll og like lang preinkubering med TTA.

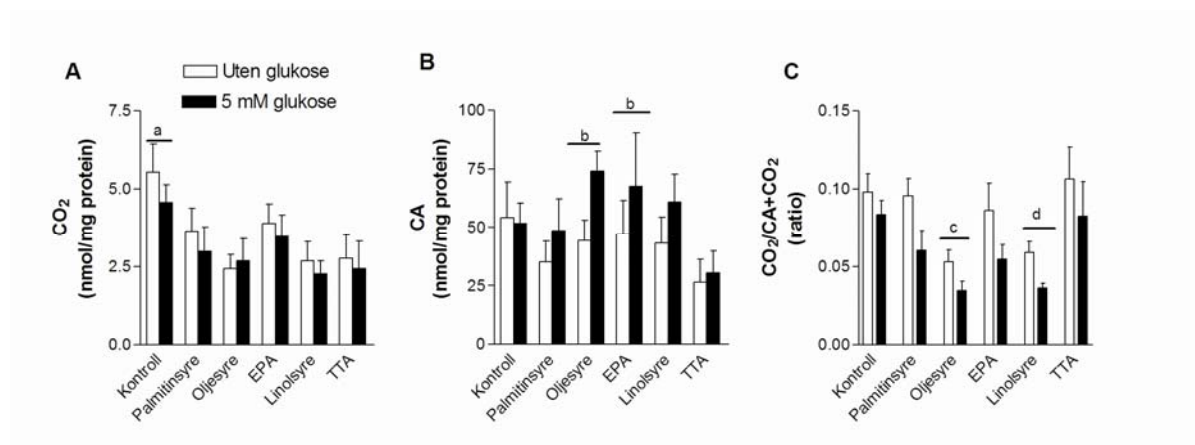


Figur 3.4 Oksidasjon av oljesyre (OA) til CO₂ (A, B), celleassosiert (CA) oljesyre (C, D) og forholdet mellom CO₂ og CA+CO₂ (E, F) etter forbehandling med enten kontroll, palmitinsyre (100 µM), oljesyre (100 µM), EPA (100 µM), linolsyre (100 µM), TTA (100 µM) eller GW (10 nM) de siste 24 timene (A, C, E) eller de siste 4 døgnene (B, D, F) av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere myotubene i 4 timer med [¹⁻¹⁴C]OA (0,273 µCi/ml, 5 µM) med eller uten 5 mM glukose i forsøksmediet. Data ble illustrert som gjennomsnitt ± SEM (n=3 à 4 paralleller).

a: $p \leq 0,05$ mot kontroll, b: $p \leq 0,05$ mot kontroll og TTA, c: $p \leq 0,05$ mot TTA, d: $p \leq 0,05$ mot kontroll og oljesyre, e: $p \leq 0,05$ mot kontroll, oljesyre og palmitinsyre, f: $p \leq 0,05$ mot EPA, linolsyre og palmitinsyre, g: $p \leq 0,05$ mot EPA og linolsyre, h: $p \leq 0,05$ mot EPA, linolsyre, oljesyre og palmitinsyre.

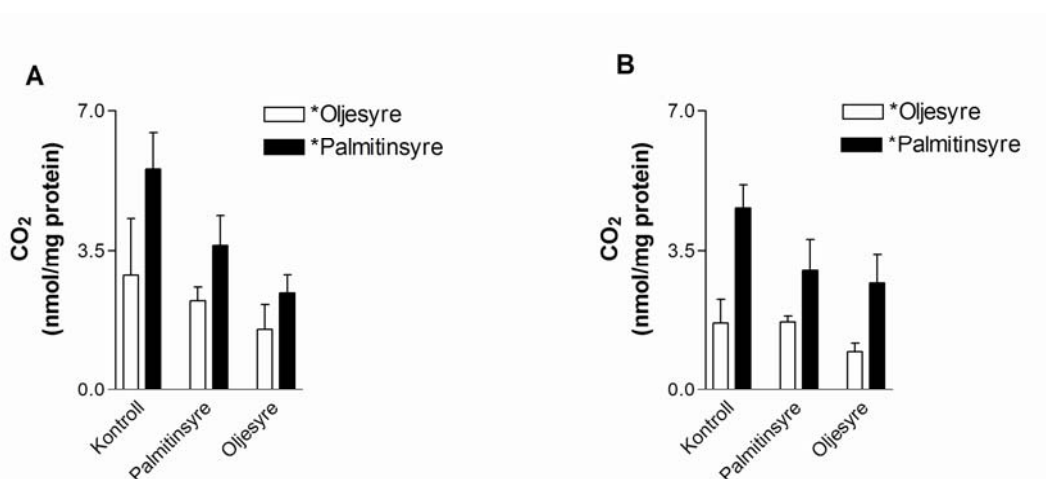
3.3 Effekter av forbehandling med ulike fettsyrer, TTA og akutt tilsetning av glukose på palmitinsyre-metabolismen

Det ble også benyttet radioaktiv palmitinsyre for å undersøke om effektene av forbehandlingene kunne gi forskjellig respons sammenlignet med radioaktiv oljesyre, med andre ord om effektene som observeres er avhengig av fettsyretypen i det akutte forsøket. Også her ble det undersøkt hvordan akutt glukosetilsetning (5 mM) påvirket palmitinsyremetabolismen etter 24 timers forbehandling med ulike fettsyrer og TTA (figur 3.5). Oksidasjon av radioaktiv palmitinsyre (100 μ M) ble svakt redusert da myotubene ble tilsatt forsøksmedium med 5 mM glukose. Den gjennomsnittlige glukosehemmingen av fettsyreoksidasjonen var på 12 % ($p=0,262$). Alle forbehandlingene førte til redusert CO_2 -produksjon sammenlignet med kontroll (figur 3.5A). Da glukose var tilstede i forsøksmediet, så det ut som om palmitinsyreopptaket økte (figur 3.5B). Glukoseøkningen var gjennomsnittlig på 33 % ($p=0,055$). Palmitinsyreopptaket var høyest etter forbehandling med oljesyre, EPA og linolsyre. Glukose hadde en mer markert effekt på ratio $\text{CO}_2/\text{CA}+\text{CO}_2$ (fraksjonell oksidasjon). Den gjennomsnittlige hemmingen var på 28,9 % ($p=0,001$) (figur 3.5C).



Figur 3.5 Oksidasjon av palmitinsyre (PA) til CO_2 (A), celleassosiert (CA) palmitinsyre (B) og forholdet mellom CO_2 og $\text{CA}+\text{CO}_2$ (C) etter forbehandling med enten kontroll, palmitinsyre (100 μ M), oljesyre (100 μ M), EPA (100 μ M), linolsyre (100 μ M), eller TTA (100 μ M) de siste 24 timene av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere myotubene i 4 timer med $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{PA}$ (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM) med eller uten 5 mM glukose i forsøksmediet. Data ble illustrert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$ à 4 paralleller). a: $p\leq 0,05$ mot alle behandlinger, b: $p\leq 0,05$ mot TTA, c: $p\leq 0,05$ mot EPA, kontroll, palmitinsyre og TTA, d: $p\leq 0,05$ mot kontroll, palmitinsyre og TTA.

For å studere omsetningen av de to radioaktive fettsyrene (palmitinsyre eller oljesyre), ble fettsyreoksidasjonen sammenlignet etter tilsetning av ikke-radioaktive fettsyrer i 24 timer (figur 3.6A og B). Oksidasjon av palmitinsyre til CO_2 var vesentlig høyere enn oksidasjonen av oljesyre både med og uten glukose i forsøksmediet. Dette gjaldt generelt for alle forbehandlingene (data ikke vist). Gjennomsnittlig var det 2 ganger økning i CO_2 -produksjonen ved nærvær av radioaktiv palmitinsyre i forhold til oljesyre ($p=0,0001\%$) (figur 3.6A og B). Både forbehandling med palmitinsyre og oljesyre i 24 timer førte til en redusert oksidasjon av begge de radioaktive fettsyrene sammenlignet med ubehandlede myotuber med eller uten glukose akutt i forsøksmediet (figur 3.6A og B). Opptaket med radioaktiv oljesyre var generelt høyere enn radioaktiv palmitinsyre (data ikke vist).



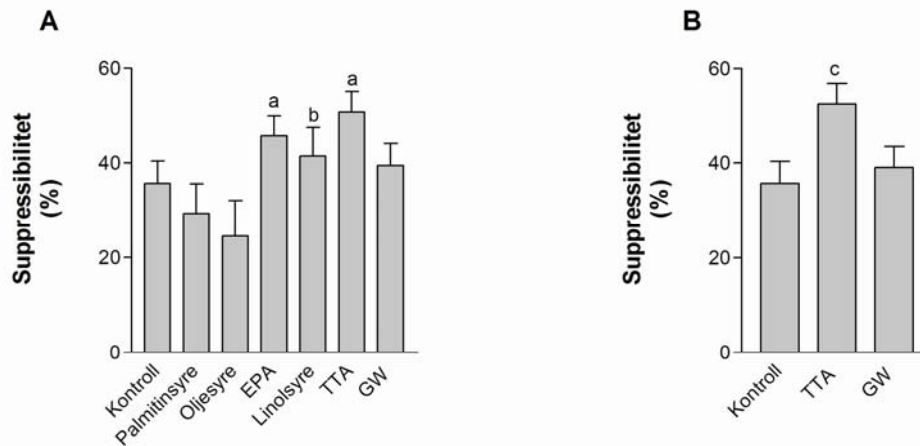
Figur 3.6 Oksidasjon av oljesyre (OA)/palmitinsyre (PA) til CO_2 etter forbehandling med enten kontroll, palmitinsyre ($100 \mu\text{M}$) eller oljesyre ($100 \mu\text{M}$) de siste 24 timene av differensieringsperioden. Eksperimentet ble utført ved å inkubere myotubene i 4 timer med $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{OA}$ ($1 \mu\text{Ci/ml}$, $100 \mu\text{M}$) eller $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{PA}$ ($1 \mu\text{Ci/ml}$, $100 \mu\text{M}$) uten (A) og med 5 mM glukose (B) i forsøksmediet. Data ble illustrert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$ à 4 paralleller).

3.4 Suppressibilitet, adapterbarhet og metabolsk fleksibilitet i humane skjelettmuskelceller

3.4.1 Suppressibilitet av glukose på fettsyreoksidasjonen

Det var ønskelig å undersøke hvordan akutt glukosetilsetning påvirket oljesyreoksidasjonen både ved lav (5 μ M) og høy (100 μ M) konsentrasjon av radioaktiv oljesyre etter ulike forbehandling av muskelcellene. Dette ble gjort ved å beregne parameteren suppressibilitet. Med suppressibilitet menes her evnen glukose (5 mM) har til å undertrykke oljesyreoksidasjonen (prosent suppressjon av oksidasjonen ved nærvær av glukose). Parameteren ble beregnet slik: $(1 - (\text{oksidasjon av oljesyre ved 5 mM glukose} / \text{oksidasjon av oljesyre ved 0 mM glukose})) \times 100 \%$ [21]. Figur 3.7A og B viser suppressibilitet ved bruk av 100 μ M radioaktiv oljesyre. 24 timers preinkubering med EPA ga økt suppressibilitet som var signifikant forskjellig sammenlignet med preinkubering med oljesyre eller palmitinsyre (figur 3.7A). Økningen av suppressibilitet etter forbehandling med EPA var på 21 % sammenlignet med oljesyre, og 16 % i forhold til palmitinsyre (figur 3.7A). Suppressibiliteten var også signifikant økt etter forbehandling av linolsyre sammenlignet med oljesyre. Her var økningen på 17 % (figur 3.7A). Forbehandling med TTA i 24 timer viste seg også å gi signifikant økt suppressibilitet sammenlignet med oljesyre og palmitinsyre. Økningen her var på henholdsvis på 26 % og 21 % (figur 3.7A). 4 døgns preinkubering med TTA ga også økt suppressibilitet på ca. 17 % sammenlignet med kontroll. Forbehandling med GW i 4 døgner ga ingen endret suppressibilitet sammenlignet med kontroll (figur 3.7B).

Ved 5 μ M radioaktiv oljesyre viste suppressibilitetsparameteren tilnærmet samme mønster som ved 100 μ M oljesyre (data ikke vist). Suppressibiliteten var økt etter forbehandling med EPA i 24 timer og TTA i 4 døgner.



Figur 3.7 Suppressibilitet av glukose på oksidasjonen av 100 µM radioaktiv oljesyre etter forbehandling med enten kontroll, palmitinsyre (100 µM), oljesyre (100 µM), EPA (100 µM), linolsyre (100 µM), TTA (100 µM) eller GW (10 nM) de siste 24 timene (A) eller de siste 4 døgnene (B) av differensieringsperioden. Parameteren betegner evnen glukosen har til å undertrykke den akutte oljesyreoksidasjonen og ble beregnet slik: $(1 - (\text{oksidasjon av oljesyre ved 5 mM glukose} / \text{oksidasjon av oljesyre ved 0 mM glukose})) \times 100\%$. Data ble illustrert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=7$ à 4 paralleller).

a: $p \leq 0,05$ mot oljesyre og palmitinsyre, b: $p \leq 0,05$ mot oljesyre, c: $p \leq 0,05$ mot kontroll.

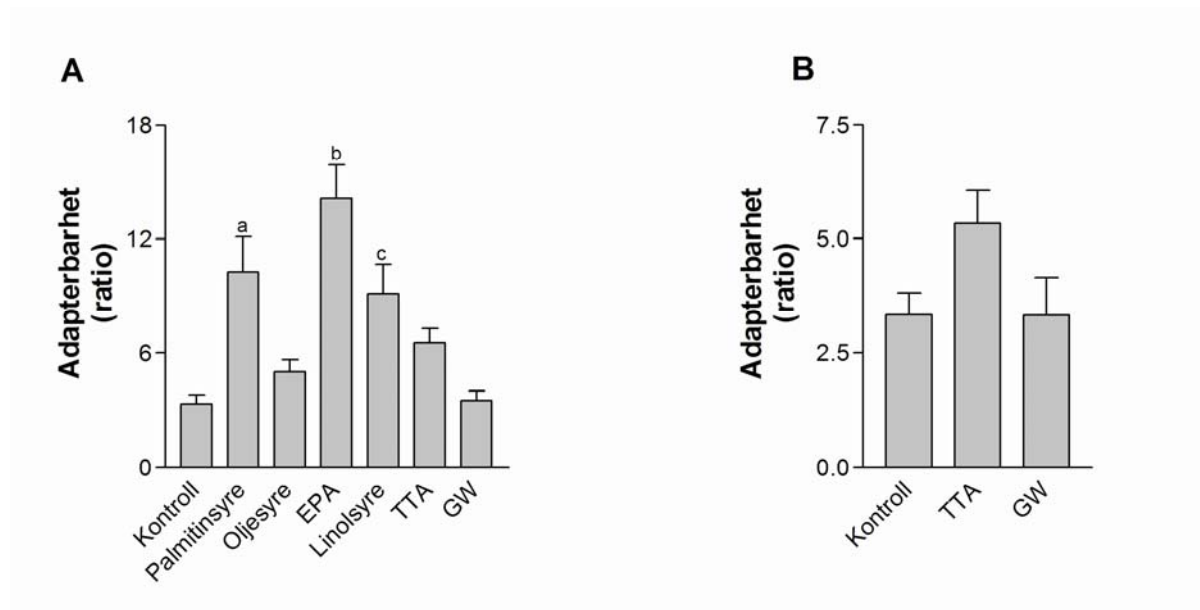
3.4.2 Fettsyreoksidasjonens adapterbarhet

En annen parameter som ble valgt for å beskrive myotubenes metabolske egenskaper, var cellenes evne til å håndtere en økt mengde fettsyre, altså adapterbarhet. Adapterbarhet er evnen myotubene har til å øke oksidasjonen av fettsyre ved tilførsel av økende konsentrasjoner av fettsyren [21]. Parameteren ble beregnet slik: $(\text{oksidasjon ved } 100 \mu\text{M oljesyre} / \text{oksidasjon ved } 5 \mu\text{M oljesyre})$ både med og uten 5 mM glukose i forsøksmediet. Det viste seg at adapterbarheten ikke var avhengig av glukose, derfor ble alle data slått sammen ved statistisk beregning.

Det var ønskelig å undersøke hvordan adapterbarheten ble påvirket av å forbehandle myotubene med ulike fettsyrer, TTA og GW de siste 24 timene og de to sistnevnte også i de siste 4 døgnene av differensieringsperioden. Adapterbarheten etter forbehandling med EPA i 24 timer viste seg å være signifikant økt sammenlignet med alle de andre forbehandlingene og i forhold til oljesyre var adapterbarheten nesten 3 ganger økt (figur 3.8A). I forhold til kontroll økte adapterbarheten med EPA hele 4 ganger (figur 3.8A). Adapterbarheten var også økt etter forbehandling med linolsyre sammenlignet med kontroll, GW og oljesyre. Med linolsyre økte adapterbarheten nesten 2 og 3 ganger sammenlignet med forbehandling

med oljesyre og kontroll. Preinkubering med palmitinsyre ga også forskjellig adapterbarhet sammenlignet med kontroll, GW, oljesyre, og TTA. Det var 3 gangers økning i adapterbarhet etter forbehandling med palmitinsyre sammenlignet med forbehandling med GW eller kontroll (figur 3.8A).

Adapterbarheten etter TTA-behandling i 4 døgn var ca. 60 % økt sammenlignet med kontroll og GW, men denne økningen var ikke signifikant (figur 3.8B).

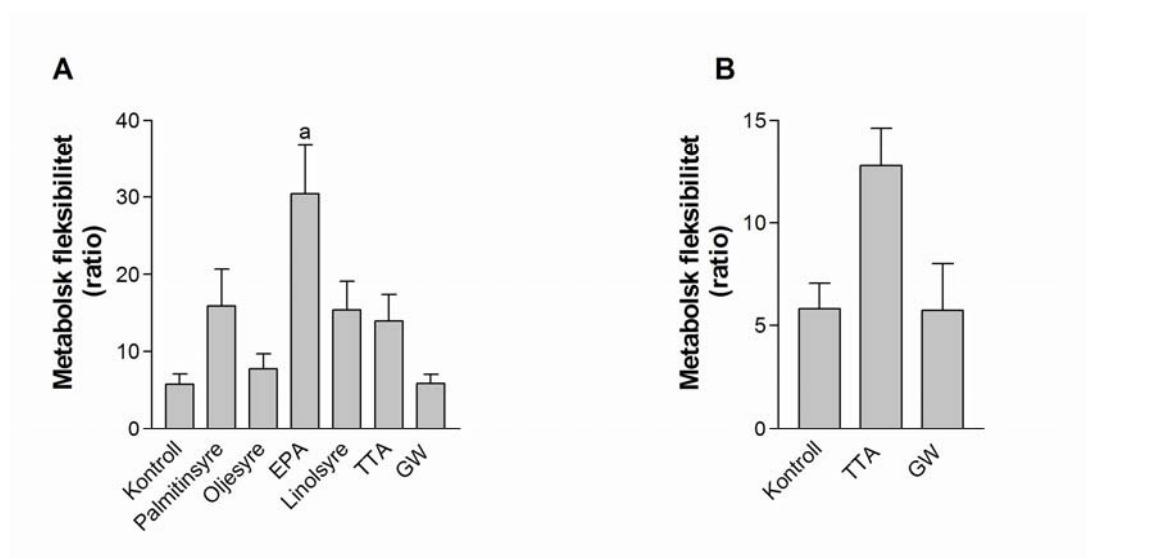


Figur 3.8 Adapterbarhet av oljesyreoksidasjonen etter forbehandling med enten kontroll, palmitinsyre (100 μ M), oljesyre (100 μ M), EPA (100 μ M), linolsyre (100 μ M), TTA (100 μ M) eller GW (10 nM) de siste 24 timene (A) eller de siste 4 døgnene (B) av differensieringsperioden. Adapterbarhet er evnen muskelcellene har til å øke oljesyreoksidasjonen ved tilførsel av økende konsentrasjon av oljesyre. Slik ble denne parameteren beregnet: (oksidasjon ved 100 μ M oljesyre/oksidasjon ved 5 μ M oljesyre). Data ble illustrert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$ à 8 paralleller). a: $p \leq 0,05$ mot GW, oljesyre, TTA og kontroll, b: $p \leq 0,05$ mot alle behandlinger, c: $p \leq 0,05$ mot GW, kontroll og oljesyre.

3.4.3 Metabolsk fleksibilitet *in vitro*

Metabolsk fleksibilitet *in vivo* betegner skjelettmuskulaturens evne til å skifte mellom oksidasjon av lipider og glukose avhengig av kroppens metabolske tilstand. Det vil si at muskelcellene i større grad foretrekker oksidasjon av fettsyrer ved faste, og oksidasjon av glukose ved insulinstimulering etter et måltid, samtidig som fettoksidasjonen undertrykkes [18]. Det ble i oppgaven benyttet en *in vitro* modell som forsøker å reflektere *in vivo* metabolsk fleksibilitet. Myotubene ble manipulert med varierende konsentrasjoner av fettsyre og glukose for å etterligne en fastende og en postprandial tilstand i cellene. Ut fra slike forsøk var det ønskelig å beregne *in vitro* metabolsk fleksibilitet. Dette er altså evnen myotubene har til å endre fettsyreoksidasjon ved overgang fra ”fastende fase” (høy fettsyrekonsentrasjon, lav glukosekonsentrasjon; 100 μ M oljesyre, 0 mM glukose) til ”postprandial fase” (lav fettsyrekonsentrasjon, høy glukosekonsentrasjon; 5 μ M oljesyre, 5 mM glukose). Slik ble parameteren beregnet: (oksidasjon av 100 μ M oljesyre i nærvær av 0 mM glukose/oksidasjon av 5 μ M oljesyre i nærvær av 5 mM glukose).

Forbehandling med EPA viste seg å være signifikant forskjellig fra alle de andre behandlingene mht. metabolsk fleksibilitet. Metabolsk fleksibilitet etter forbehandling med EPA var signifikant 4 ganger høyere enn etter forbehandling med oljesyre, og hele 5 ganger høyere i forhold til kontroll (figur 3.9A). Fleksibiliteten etter forbehandling med palmitinsyre, linolsyre og TTA i 24 timer var ikke signifikant forskjellig fra kontroll, men alle tre forbehandlingene økte denne parameteren cirka 2,5 ganger (figur 3.9A). Forbehandling med TTA i 4 døgn ga ikke signifikant forskjellig fleksibilitet sammenlignet med kontroll og GW, men fleksibiliteten økte mer enn 2 ganger (figur 3.9B). Preinkubering med GW ga ingen effekt på fleksibilitetsparameteren, verken etter 24 timers eller 4 døgn forbehandling (figur 3.9A og B).



Figur 3.9 Metabolisk fleksibilitet av myotubene etter forbehandling med enten kontroll, palmitinsyre (100 μ M), oljesyre (100 μ M), EPA (100 μ M), linolsyre (100 μ M), TTA (100 μ M) eller GW (10 nM) de siste 24 timene (A) eller de siste 4 døgnene (B) av differensieringsperioden. Fleksibilitet betegner myotubenes evne til å redusere oljesyreoksidasjonen ved overgang fra fastende fase til postprandial fase (etter måltid). Slik ble parameteren beregnet: (oksidasjon av 100 μ M oljesyre og 0 mM glukose)/ (oksidasjon av 5 μ M oljesyre og 5 mM glukose) Data ble illustrert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$ à 4 paralleller).

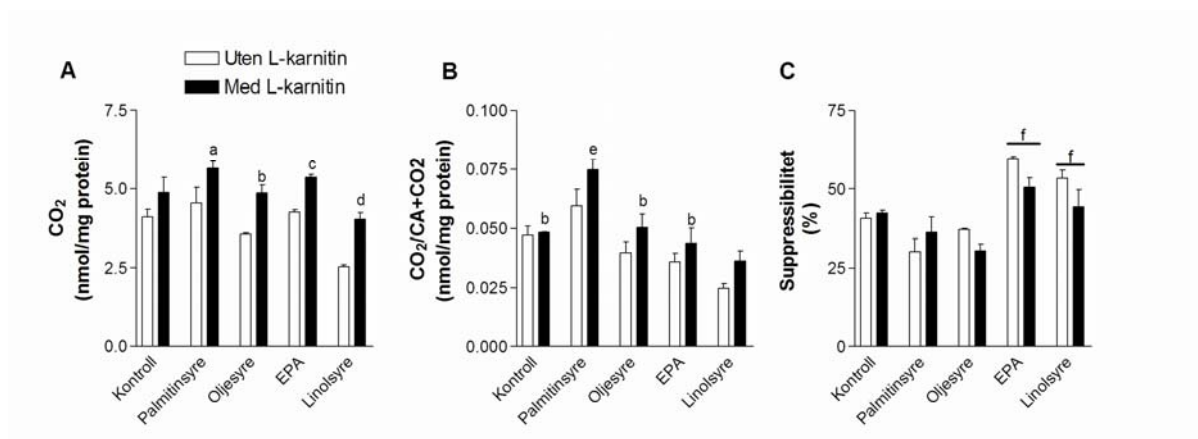
a: $p \leq 0,05$ mot alle behandlinger.

3.4.4 Effekt av L-karnitin på oljesyremetabolismen og suppressibilitet av glukose

L-karnitin er kjent for å stimulere fettsyreoksidasjonen ved å øke opptak av fettsyrer i mitokondriene. Koves *et al.* [35] undersøkte om insulinsensitiviteten i skjelettmuskelceller ble endret ved å blokkere karnitineffekten, og fant ut at lipidindusert insulinresistens ble forebygget ved å hemme fettsyreopptak inn i mitokondriene [35]. Derfor var det av interesse å undersøke om omsetningen av oljesyre (100 μ M) i myotubene ble endret etter 24 timers forbehandling med L-karnitin og ulike fettsyrer samtidig, og om dette kunne påvirke glukosesuppresjonen. Det ble observert en liten økning av CO_2 -produksjon etter forbehandling med L-karnitin i forhold til myotuber som ikke ble preinkubert med karnitin. Dette gjaldt både for forsøksmedium uten glukose (figur 3.10A) og med 5 mM glukose tilsatt (data ikke vist). Den gjennomsnittlige karnitinøkningen med og uten glukose var på 32 % ($p=0,0001$). Som allerede vist i figur 3.2A ble oksidasjonen av oljesyre redusert da myotubene ble tilsatt glukose i forsøksmediet sammenlignet med 0 mM glukose (data ikke vist). Den gjennomsnittlige glukosehemningen av fettsyreoksidasjonen var på 42 % ($p=0,0001$). Forbehandling med palmitinsyre i 24 timer viste høyest oksidasjon av oljesyre

sammenlignet med de andre forbehandlingene (figur 3.10A). Oljesyreopptaket i myotubene viste små endringer etter forbehandling med L-karnitin sammenlignet med myotuber som ikke ble preinkubert med L-karnitin (data ikke vist). Ratio $\text{CO}_2/\text{CA}+\text{CO}_2$ viste samme mønster som for oksidasjon av oljesyre til CO_2 (figur 3.10B). Fraksjonell oksidasjon økte etter forbehandling med L-karnitin i forhold til myotuber som ikke ble preinkubert med L-karnitin. Med forsøksmedium uten glukose var karnitinøkningen på 24 % ($p=0,003$) (figur 3.10B).

Suppressibilitet etter forbehandling med L-karnitin ble også sammenlignet med suppressibilitet uten denne forbehandlingen (figur 3.10C). Da man tok gjennomsnitt av alle forbehandlingene, var suppressjonen ved glukose marginalt høyere (8 %, $p=0,130$) uten forbehandling med L-karnitin. Høyest suppressjon ble som tidligere observert etter forbehandling med EPA og linolsyre.

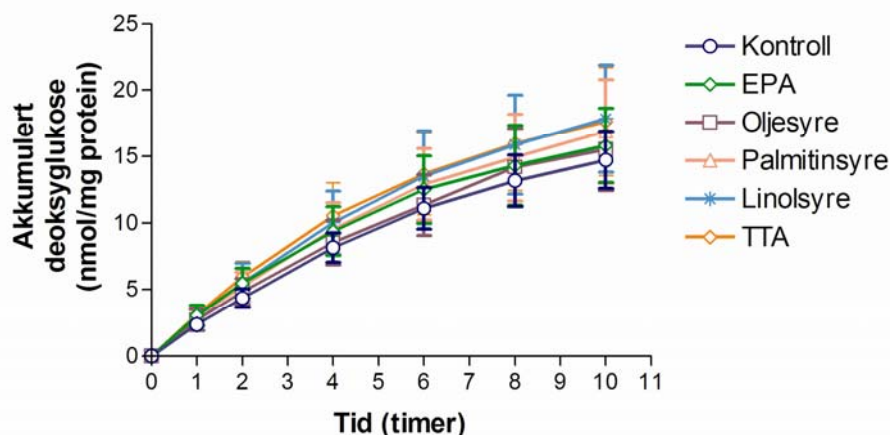


Figur 3.10 Oksidasjon av oljesyre (OA) til CO_2 (A) og forholdet mellom CO_2 og $\text{CA}+\text{CO}_2$ (B) etter forbehandling med enten kontroll, palmitinsyre (100 μM), oljesyre (100 μM), EPA (100 μM) eller linolsyre (100 μM) og \pm L-karnitin (1 mM) de siste 24 timene av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere myotubene i 4 timer med [$1\text{-}^{14}\text{C}$]OA (1 $\mu\text{Ci/ml}$, 100 μM) uten glukose i forsøksmediet. Suppressibilitet av glukose på oksidasjonen av 100 μM radioaktiv oljesyre (C) etter nevnte forbehandling de siste 24 timene av differensieringsperioden. Data ble illustrert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$ à 4 paralleller).

a: $p \leq 0,05$ mot kontroll, linolsyre og oljesyre, b: $p \leq 0,05$ mot linolsyre, c: $p \leq 0,05$ mot linolsyre og oljesyre, d: $p \leq 0,05$ mot kontroll, e: $p \leq 0,05$ mot alle behandlinger, f: $p \leq 0,05$ mot kontroll, oljesyre og palmitinsyre.

3.5 Effekter av forbehandling med ulike fettsyrer, TTA, GW501516 og akutt tilsetning av insulin på glukosemetabolismen

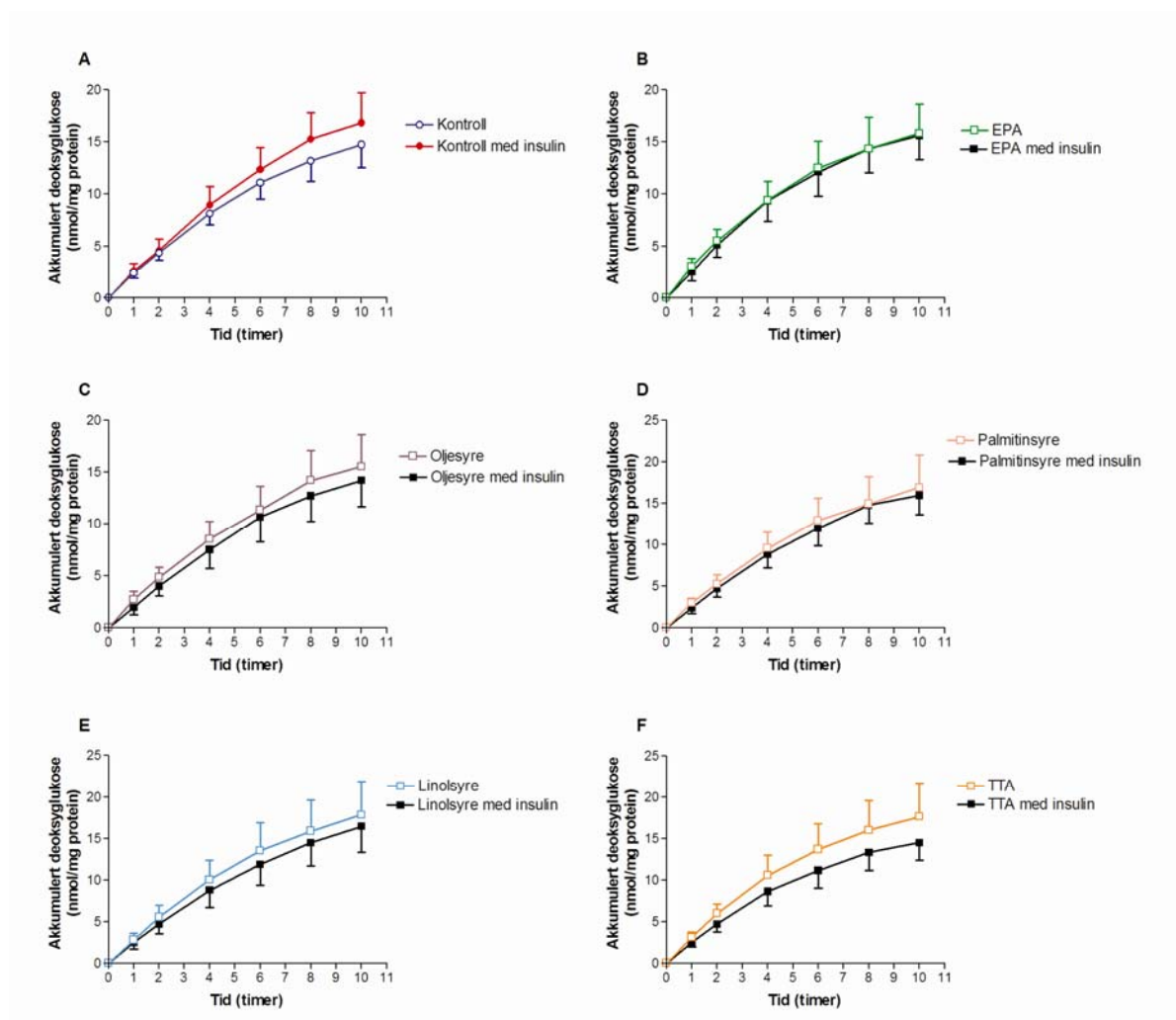
Det var også av interesse å undersøke om noen av forbehandlingene (fettsyrer, TTA og GW) kunne påvirke glukosemetabolismen, og om eventuelle effekter kunne sammenlignes med de metabolske parameterne som ble beregnet. Effekten på akkumuleringen (glukoseopptaket) av deoksyglukose (DOG, 100 μ M) i myotubene med eller uten akutt insulin (100 nM) ble undersøkt etter forbehandling med ulike fettsyrer og TTA i 24 timer. Måling av akkumuleringen av deoksyglukose ble gjort ved hjelp av "Scintillation proximity assay" (SPA). Denne metoden kan måle akkumulering av radioaktiv DOG ved ulike tidspunkter i myotubene uten at de må høstes. Figur 3.11 viser akkumulert DOG uten tilstedeværelse av insulin i forsøksmediet etter forbehandling med ulike substanser. Tidskurvene lå svært tett inntil hverandre, det var ingen klare effekter av forbehandlingene.



Figur 3.11 Akkumulering av deoksyglukose etter forbehandling med enten kontroll, EPA (100 μ M), oljesyre (100 μ M), palmitinsyre (100 μ M) eller linolsyre (100 μ M) de siste 24 timene av differensieringsperioden. Eksperimentet ble utført ved å inkubere myotubene med [U - 14 C]deoksyglukose (1 μ Ci/ml, 100 μ M) uten insulin i forsøksmediet. Akkumulering av deoksyglukose ble målt ved gitte tider indikert på x-aksen. Data ble illustrert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$ à 4 paralleller).

Ubehandlede myotuber (kontroll) viste en liten insulinrespons, og over tid økte akkumuleringen av DOG (figur 3.12A). Forbehandling med EPA, oljesyre, palmitinsyre, linolsyre eller TTA ga alle økt akkumulering av DOG over tid, både med og uten tilstedeværelse av insulin i forsøksmediet. Ingen tydelig insulinrespons ble observert etter forbehandling av myotubene med disse stoffene (figur 3.12B-F). Forbehandling med GW

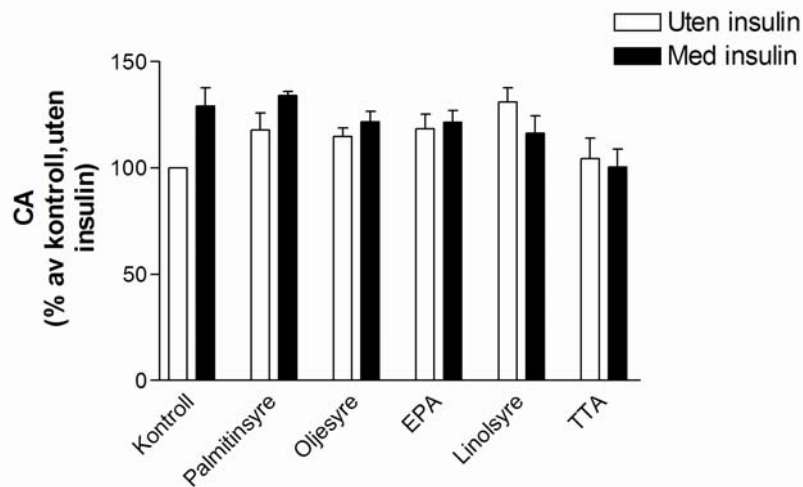
(10 nM) i 24 timer viste økt akkumulering av DOG sammenlignet med kontroll. Dette gjaldt både med og uten insulin tilsatt i forsøksmediet (data ikke vist, $n=1$). 4 dagers preinkubering med GW (10 nM) viste ikke samme mønster. Her var effekten av GW lik kontrollen på akkumuleringen av DOG (data ikke vist, $n=1$).



Figur 3.12 Akkumulering av deoksyglukose etter forbehandling med enten kontroll, EPA (100 μ M), oljesyre (100 μ M), palmitinsyre (100 μ M) eller linolsyre (100 μ M) de siste 24 timene av differensieringsperioden. Eksperimentet ble utført ved å inkubere myotubene med [U - 14 C]deoksyglukose (1 μ Ci/ml, 100 μ M) med eller uten 100 nM insulin i forsøksmediet. Akkumulering av deoksyglukose ble målt ved gitte tider indikert på x-aksen. Data ble illustrert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$ à 4 paralleller).

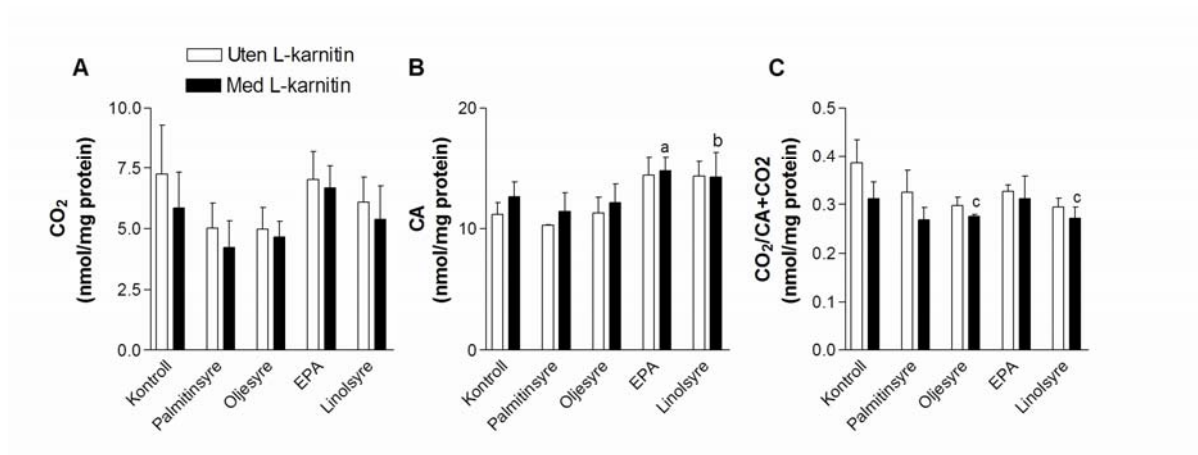
Etter endt SPA-forsøk med DOG ble det målt celleassosiert deoksyglukose etter lysering av myotubene med NaOH. Dette ble gjort for å sammenligne akkumuleringen målt ved SPA-tidskurvene etter 10 timer i figur 3.12. Celleassosiert DOG etter 10 timer viste omtrent samme mønster som endepunktet for tidskurvene til fettsyrene, TTA og kontrollmyotubene

(figur 3.13). Insulinrespons (delta insulin) var signifikant lavere etter forbehandling med linolsyre og TTA i forhold til kontroll.



Figur 3.13 Celleassosiert (CA) deoksyglukose etter forbehandling med enten kontroll, palmitinsyre (100 μ M), oljesyre (100 μ M), EPA (100 μ M), linolsyre (100 μ M) eller TTA (100 μ M) de siste 24 timene av differensieringsperioden og etter måling av akkumulering av [14 C]deoksyglukose (1 μ Ci/ml, 100 μ M) med eller uten 100 nM insulin i forsøksmediet. Data ble illustrert som gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$ à 4 paralleller).

Det var også ønskelig å undersøke om omsetningen av U-glukose i myotubene ble endret ved forbehandling med ulike fettsyrer i 24 timer, med eller uten L-karnitin under forbehandlingen. En liten reduksjon i CO_2 -produksjonen ble observert etter forbehandling med L-karnitin. Med karnitinforbehandling gikk CO_2 -produksjonen ned med gjennomsnittlig 11 % ($p=0,304$) med forsøksmedium uten insulin tilstede (figur 3.14A). Med 100 nM insulin i forsøksmediet ble det også registrert nedgang i CO_2 -produksjonen (data ikke vist). Her var den gjennomsnittlige nedgangen på 16 % ($p=0,015$). Forbehandling med EPA og linolsyre påvirket ikke oksidasjonen sammenlignet med de ubehandlede myotubene (kontroll). Opptak av U-glukose i myotubene viste en marginal, men ikke signifikant, økning med L-karnitin ($p=0,329$). Forbehandling med EPA og linolsyre førte til økt opptak av U-glukose både uten og med L-karnitinforbehandling (figur 3.14B). Ratio $\text{CO}_2/\text{CA}+\text{CO}_2$ (fraksjonell oksidasjon) viste heller ingen stor forskjell mellom karnitinforbehandlingene og fettsyrebehandlingene (figur 3.14C). Fraksjonell oksidasjon gikk ned gjennomsnittlig 12 % ($p=0,049$) uten insulin tilstede i forsøksmediet med L-karnitin.

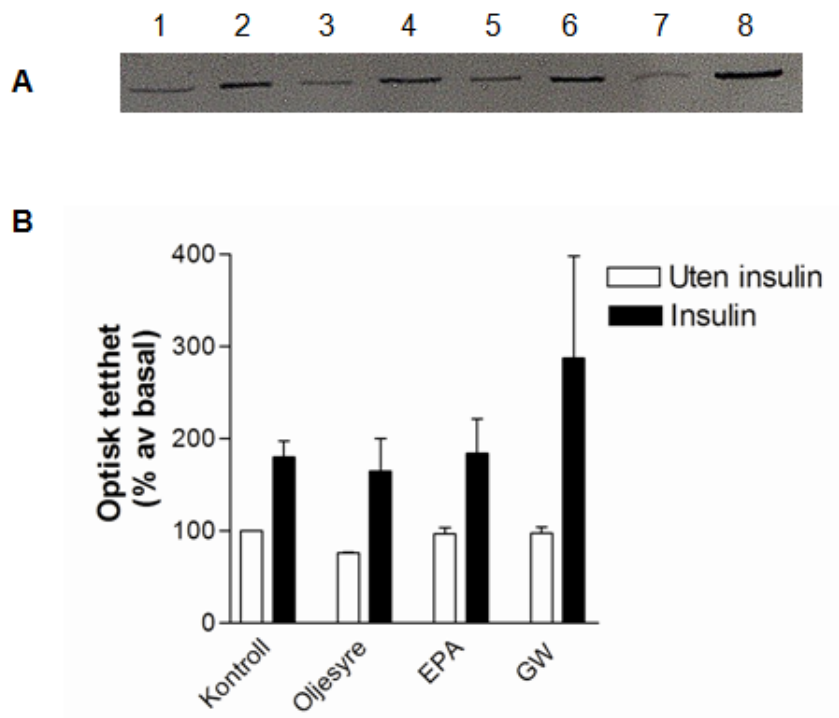


Figur 3.14 Oksidasjon av U-glukose til CO₂ (A), celleassosiert (CA) U-glukose (B) og forholdet mellom CO₂ og CA+CO₂ (C) etter forbehandling med enten kontroll, palmitinsyre (100 µM), oljesyre (100 µM), EPA (100 µM) eller linolsyre (100 µM) og ± L-karnitin (1 mM) de siste 24 timene av differensieringsperioden. Eksperimentene ble utført ved å inkubere myotubene i 4 timer med [U-¹⁴C]glukose (0,5 µCi/ml, 100 µM) uten insulin i forsøksmediet. Data ble illustrert som gjennomsnitt ± SEM (n=2 à 4 paralleller). a: p≤0,05 mot kontroll, oljesyre og palmitinsyre, b: p≤0,05 mot oljesyre og palmitinsyre, c: p≤0,05 mot kontroll.

3.6 Effekter av forbehandling med ulike fettsyrer og GW på insulinsignaleringen

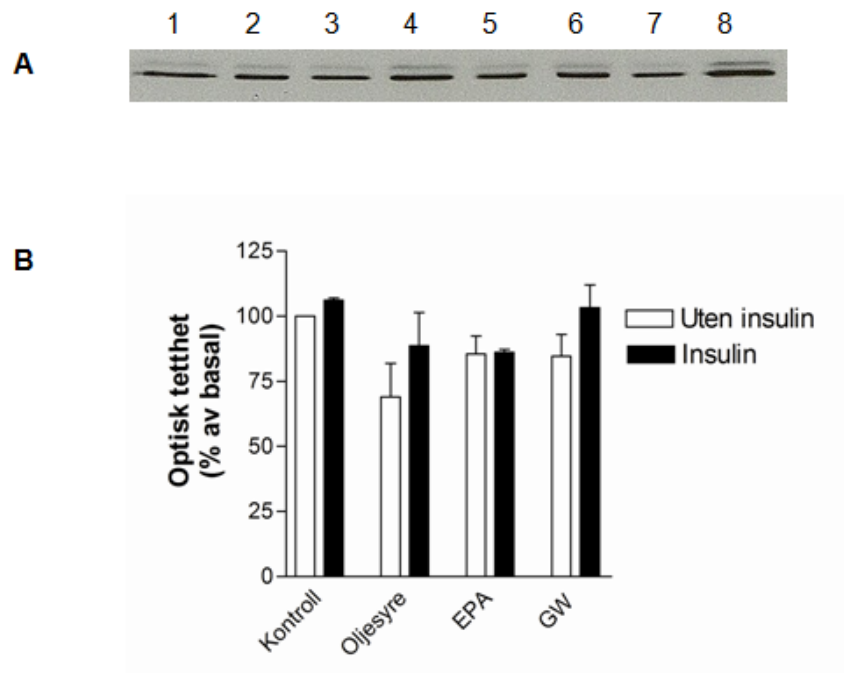
Westernblotting av fosforylert Akt og ERK, to signalmolekyler nedstrøms for insulinreseptoren, ble valgt for å undersøke effekten på myotubenes følsomhet for insulin etter forbehandling med fettsyrer og GW. Fosforylert Akt ble valgt siden denne er en sentral del av insulinsignalveien (figur 1.4). Måling av dette proteinet kan kanskje gi indirekte informasjon om glukoseopptaket siden fosforylert Akt blant annet er med i reguleringen av GLUT-4 translokasjonen.

Tilsetning av insulin i 15 minutter ga økt Akt-fosforylering ved alle forbehandlingene ("overall" insulineffekt: p=0,002). Forbehandling med EPA eller oljesyre påvirket ikke aktiviteten av insulinstimulert Akt sammenlignet med ubehandlede celler (kontroll). Myotuber som hadde blitt forbehandlet med GW i 4 døgn viste tendens til økt aktivitet av insulinstimulert Akt (figur 3.15). Preinkubering med GW førte til at Akt-fosforyleringen var cirka 30 % høyere enn i ubehandlede celler, men denne økningen var ikke signifikant.



Figur 3.15 Effekter av forbehandling med ulike fettsyrer og GW på fosforylering av Akt. Myotuber ble preinkubert enten med kontroll, oljesyre (100 μ M), EPA (100 μ M) i de siste 24 timene eller GW (10 nM) i de siste 4 døgnet av differensieringsperioden. På differensieringsdag 7 ble myotubene ytterligere preinkubert med dH_2O eller insulin (100 nM) i 15 minutter. Westernblotting ble utført med antistoff rettet mot fosforylert Akt. A: Et representativt forsøk. Brønn 1, 3, 5 og 7 er henholdsvis kontroll, oljesyre, EPA og GW uten insulin. I brønn 2, 4, 6, og 8 er det lagt til insulin til de samme behandlingene. B: Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM og oppgitt i relative verdier hvor kontroll uten insulin er satt til 100 % ($n=3$ individuelle forsøk).

Westernblotting med antistoff mot fosforylert ERK viste at ERK-signalveien sannsynligvis ikke er viktig i insulinsignaleren i myotubene. Det ble ikke registrert mer fosforylering av ERK etter insulinpåvirkning. Forskjellene i aktiviteten av ERK mellom de ulike forbehandlingene var svært små (figur 3.16).



Figur 3.16 Effekter av forbehandling med ulike fettsyrer og GW på fosforylering av ekstracellulær signalregulert kinase (ERK). Myotuber ble preinkubert enten med kontroll, oljesyre (100 μ M), EPA (100 μ M) i de siste 24 timene eller GW (10 nM) i de siste 4 døgne av differensieringsperioden. På differensieringsdag 7 ble myotubene ytterligere preinkubert med dH_2O eller insulin (100 nM) i 15 minutter. Westernblotting ble utført med antistoff rettet mot fosforylert ERK. A: Et representativt forsøk. Brønn 1, 3, 5 og 7 er henholdsvis kontroll, oljesyre, EPA og GW uten insulin. I brønn 2, 4, 6, og 8 er det lagt til insulin til de samme behandlingene. B: Data er presentert som gjennomsnitt \pm SEM og oppgitt i relative verdier hvor kontroll uten insulin er satt til 100 % ($n=3$ individuelle forsøk).

4. Diskusjon

Økt lipidtilgjengelighet er antatt å spille en rolle i utvikling av insulinresistens i skjelettmuskelceller [13, 15, 39]. Det har lenge vært kjent at økt nivå av frie fettsyrer og triglyserider i plasma er assosiert med insulinresistens *in vivo* i humane studier [39]. Både mengde og type fett er viktig. Dietter med mye mettede fettsyrer kan føre til insulinresistens som et resultat av endringer i oksidative egenskaper i skjelettmuskel [40]. Akkumulering av fett i muskel (intramyotubulære lipider) kan også være en medvirkende årsak til utvikling av insulinresistens. Dette er bakgrunnen for at ulike fettsyrer ble valgt til forbehandling av myotubene for å undersøke om metabolismen av radioaktive substanser ble endret. TTA og GW ble valgt fordi det er vist at disse substansene øker lipidoksidasjonen, med andre ord fungerer de som positiv kontroll. EPA og linolsyre er vist å bedre insulinfølsomheten i skjelettmuskel *in vivo*. Palmitinsyre og oljesyre ble valgt som kontroller.

4.1 Fettsyre- og glukoseeffekter på humane skjelettmuskelceller

4.1.1 Effekter av forbehandling med ulike fettsyrer

Akutt oksidasjon av oljesyre (5 μM eller 100 μM) til CO_2 etter forbehandling med ulike fettsyrer var lik eller redusert sammenlignet med fettsyrefri kontroll (figur 3.2A og B og 3.4A og B). Heller ikke GW eller TTA ga signifikant økt fettsyreoksidasjon etter 24 timers forbehandling, men etter 4 døgn med GW var oksidasjonen økt. Tendens til redusert oksidasjon etter fettsyrebehandling trenger ikke å bety at den totale fettsyreoksidasjonen er nedsatt, siden det ikke ble målt intracellulær lipidoksidasjon i disse forsøkene. Det er mulig at frie fettsyrer kan påvirke oksidasjonen av oljesyre og være en medvirkende faktor som bidrar til utvikling av insulinresistens. Tendens til redusert lipidoksidasjon etter forbehandling med EPA og palmitinsyre i skjelettmuskelceller er i samsvar med resultatene fra Aas *et al.* [16, 28]. I disse artiklene er det heller ikke undersøkt intracellulært lipidlager og oksidasjon fra dette. Det ble observert økt inkorporering av radioaktiv oljesyre (100 μM) i myotubene etter forbehandling med EPA og linolsyre (figur 3.2C og 3.3). Det er uvisst om oljesyre i disse forsøkene er inkorporert som triglyserider, kolesterolistere eller fosfolipider,

men tidligere data har vist at etter 24 timer vil 70-80 % av oljesyren gjenfinnes i TAG-fraksjon (personlig meddelelse, Arild Ch. Rustan). Aas *et al.* [28] viste at forbehandling med EPA førte til at den radioaktive oljesyren ble lagret som fosfolipider og TAG, men der ble myotubene preinkubert med 600 μ M fettsyre [28]. Det er viktig å ha en balanse mellom lipolyse og lipidsyntese i skjelettmuskel [41]. Økt lipolyse av TAG kan føre til økt frigjørelse av frie fettsyrer, som kan være med å utvikle insulinresistens over tid. På en annen måte kan syntese av TAG fjerne lipotoksiske intermediater som kan forårsake celledskade. Redusert oksidasjon av fettsyrer kan øke TAG-lageret i muskel. Dette kan være ugunstig siden akkumulering av TAG er assosiert med insulinresistens [42].

Ved sammenligning av radioaktiv palmitinsyre og oljesyre viste det seg at CO₂-produksjonen fra palmitinsyre var vesentlig større enn fra oljesyre (figur 3.6). Dette er i overensstemmelse med resultater fra Gaster *et al.* [27]. I tillegg var opptaket av fettsyre i myotubene høyest ved bruk av radioaktiv oljesyre. Gaster *et al.* [27] har vist at myotuber som ble inkubert med radioaktiv palmitinsyre ga økt inkorporering til DAG og TAG, mens oljesyre ble akkumulert som intracellulære frie fettsyrer. Disse observasjonene indikerer at oljesyre er å foretrekke siden denne i mindre grad blir lagret som DAG og TAG enn palmitinsyre [27]. Både forbehandling med ikke-radioaktiv palmitinsyre og oljesyre førte her til reduksjon av oksidasjonen av begge radioaktive fettsyrer sammenlignet med ubehandlede myotuber.

4.1.2 Effekter av akutt tilsetning av glukose

Samspillet mellom glukose- og lipidmetabolismen i skjelettmuskel er nøye regulert [19]. Turcotte *et al.* undersøkte hvordan karbohydrattilgjengelighet i rotter *in vivo* påvirket lipidoksidasjonen i perfusert muskel. Ved tilstedeværelse av karbohydrater ble oksidasjonen av fettsyrene redusert [43]. Det var ønskelig å undersøke hvordan akutt glukosetilsetning påvirket metabolismen av radioaktiv fettsyre etter 24 timers forbehandling med ulike fettsyrer, TTA og GW. Det ble også gjort forsøk med 4 døgns forbehandling med de to sistnevnte. Forsøk der myotuber ble eksponert for radioaktiv oljesyre med og uten glukose (5 mM) i forsøksmediet viste at glukose førte til en økning av celleassosiert oljesyre (figur 3.2C og D). Økningen av oljesyreopptaket ved tilstedeværelse av glukose i mediet kan ha ulike årsaker. En forklaring kan være at en betydelig del av glukosen blir omdannet til glyserol som inngår i lagringslipider i cellen, og at lipogenesen og forestring av oljesyre til

komplekse lipider øker. En annen mulig forklaring kan være at når glukose brytes ned i cellen blir det dannet mer ATP til å drive acyl-CoA syntetase. Dette enzymet aktiverer fettsyrer for transport inn i den ytre membranen i mitokondriene [26] og for forestring til komplekse lipider. Det ble også sett en betydelig redusert oksidasjon av oljesyre til CO₂ ved tilstedeværelse av glukose i forsøksmediet (figur 3.2A og B og 3.4A og B). Årsaken til denne hemmingen kan være at når glukose metaboliseres blir det dannet mer malonyl-CoA. Malonyl-CoA er forløperen for fettsyredannelsen i lipogenesen, og har evnen til å hemme karnitin palmitoyltransferase-1 (CPT-1) [44]. CPT-1 er det hastighetsbegrensende enzymet i fettoksidasjonen [44], og hemming av denne transportøren vil medføre redusert fettsyreoksidasjon. Ved tilsetning av glukose akutt til forsøksmediet ble altså mer oljesyre lagret i forhold til det som ble oksidert, og nettoeffekten ble derfor akkumulering (lagring) av radioaktiv oljesyre. Disse resultatene er i samsvar med Turcotte *et al.* [43].

4.2 Metabolske parametere

Metabolsk fleksibilitet betegner skjelettmuskelcellenes evne til å skifte mellom oksidasjon av lipider og glukose. Ved faste vil fettsyrer først og fremst oksideres til energi, og glukose vil forbrukes under insulinstimulering etter et måltid, samtidig som fettsyreoksidasjonen undertrykkes [18]. På grunnlag av resultater etter forbehandlingene ble det beregnet *in vitro* parametere (suppressibilitet, adapterbarhet og metabolsk fleksibilitet) som kanskje kunne si noe om *in vivo* metabolsk fleksibilitet. Suppressibilitet er som nevnt evnen glukose har til å undertrykke fettsyreoksidasjonen i myotubene. Forbehandling med EPA, linolsyre og TTA viste økt suppressjon (figur 3.7A og B). Dette betyr at myotubene er mer følsomme for effekten av glukose (mindre fettsyreoksidasjon når glukose er tilstede) etter forbehandling med EPA, linolsyre og TTA. Glukosens evne til å undertrykke fettsyreoksidasjonen er i samsvar med resultatene fra Koves *et al.* som fant at tilsetning av pyruvat reduserte lipidoksidasjonen i isolerte mitokondrier fra rotter [35]. Ukropcova *et al.* [21] gjorde en *in vitro in vivo* sammenligning på hvordan glukose påvirket fettsyreoksidasjonen hos 16 friske unge menn. Det ble undersøkt hvordan skjelettmuskelcellenes kapasitet til å oksidere fettsyrer *in vitro* reflekterte donorens metabolske karakteristika. Grad av insulinresistens var relatert til grad av glukosesuppresjon, de mest insulinresistente individene viste høyest grad av glukosesuppresjon i muskelcellene [21]. Imidlertid er det stor sannsynlighet for at det etter matinntak hos friske, tynne individer er gunstig med høy suppressibilitet. Det kan tenkes

at effekten av suppressibilitet er annerledes hos type 2-diabetikere eller hos individer som er predisponerte for sykdommen (insulinresistente, glukoseintolerante eller overvektige individer). Hos disse individene er det høy glukosekonsentrasjon i blodet over en lang periode, selv ved fastende tilstand. Dersom disse individene har høy suppressjon over en lang periode, kan dette føre til akkumulering av intracellulære lipider i skjelettmuskulaturen. Akkumulering av intracellulære lipider er vist å korrelere med nedsatt insulinfølsomhet og dermed utvikling av type 2-diabetes [45]. Suppressibilitet ved bruk av radioaktiv palmitinsyre var generelt lav (data ikke vist). Dette bekrefter at palmitinsyre muligens er en ugunstig fettsyre siden celler behandlet akutt med palmitinsyre ikke er følsomme for glukose.

Adapterbarhet beskriver evnen myotubene har til å øke oksidasjonen av fettsyre ved tilførsel av økende konsentrasjon av fettsyren [21]. Vi har beregnet adapterbarhet som oksidasjon ved 100 μM oljesyre/oksidasjon ved 5 μM oljesyre, mens Ukropcova *et al.* beregner adapterbarhet som oksidasjon ved 100-120 μM palmitinsyre/oksidasjon ved 20 μM palmitinsyre [21]. Forbehandling med EPA og linolsyre ga høy adapterbarhet mhp. oljesyre sammenlignet med de andre substansene som ble benyttet under preinkuberingen (figur 3.8A og B). EPA og linolsyre førte til økt evne hos myotubene til å øke oljesyreoksidasjonen med økende oljesyrekonsentrasjon. Økt adapterbarhet i myotuber etter forbehandling med EPA og linolsyre skyldes sannsynligvis at cellene har økt kapasitet for lagring av fettsyrer. Ukropcova *et al.* viste at personer med høy insulinsensitivitet viste høyest grad av adapterbarhet, noe som indikerer at høy adapterbarhet er gunstig [21].

In vitro metabolsk fleksibilitetsparameteren representerer en kombinasjon av både suppressibilitet og adapterbarhet. Forbehandling med EPA ga høyest fleksibilitet (figur 3.9A og B). Myotubene som har blitt forbehandlet med EPA har en større evne til å redusere oljesyreoksidasjonen når glukose er tilstede etter et måltid, og tilsvarende øke oljesyreoksidasjonen når glukose fjernes.

In vitro resultatene kan gi en pekepinn på hvordan forholdene er *in vivo*, men man kan ikke trekke sikre konklusjoner ut fra slike *in vitro* forsøk. *In vitro* resultater bør valideres *in vivo*. *In vivo* er situasjonen mye mer kompleks enn det vi klarer å få frem i *in vitro* modeller, på grunn av at det i *in vitro* modeller mangler blant annet samspill mellom ulike organer, tilstedeværelse av hormoner, adipokiner, kofaktorer og inflammatoriske mediatorer. Samtidig er *in vitro* cellemodel svært nyttig når man ønsker å studere enkeltmekanismer uten

påvirkning av mange andre faktorer. Man har også bedre kontroll på betingelsene og de kan også manipuleres underveis.

4.3 Glukosemetabolisme

Forbehandling med ulike fettsyrer viste ingen effekt på glukoseopptaket, vist ved akkumulering av DOG (figur 3.11 og 3.12). Dette er i motsetning til hva Aas *et al.* [28] viste. De viste redusert glukoseopptak etter forbehandling med OA og økt glukoseopptak etter EPA. En mulig forklaring på disse forskjellene kan være at Aas *et al.* [28] forbehandlet myotubene med høyere konsentrasjon av fettsyre (600 μM) og at glukoseopptaket har blitt målt på forskjellige måter.

Det så ut som om det var en sammenheng mellom glukosesuppresjonen (figur 3.7A) og basalt (ikke insulinstimulert) U-glukoseopptak (figur 3.14B). Der glukose undertrykker oljesyreoksidasjonen mest (etter forbehandling med EPA og linolsyre), er det høyest opptak av U-glukose. Det ble beregnet korrelasjon mellom disse to parametere og denne viste seg å være signifikant ($p=0,033$).

4.4 Effekter av forbehandling med L-karnitin

Koves *et al.* [35] har rapportert at insulinresistens kan være forårsaket av økt, istedenfor redusert, hastighet på β -oksidasjonen i skjelettmuskulaturen. Økt mengde fettsyrer og β -oksidasjon i mitokondriene kan føre til høyere konsentrasjon av metabolitter enn det som kan bli ledet gjennom Krebszyklus. Dette kan resultere i toksiske intermediater som kan føre til insulinresistens. Siden L-karnitin er kjent for å stimulere fettsyreoksidasjonen, ble β -oksidasjonen blokkert ved å benytte en CTP1-hemmer (etomoxir). Koves *et al.* viste at insulinresponsen ble gjenopprettet *in vitro* i L6-rotte skjelettmuskelceller målt ved Akt fosforylering da CTP1 ble hemmet [35]. I mus hvor genet til malonyl-CoA dekarboxylase (MCD) er ”knocket” ut ser man økt mengde malonyl-CoA som igjen hemmer CTP1. Disse musene var beskyttet mot diettindusert insulinresistens [35]. Dette var bakgrunnen for at vi ble interessert i L-karnitinforbehandling av skjelettmuskelcellene. Resultatene i våre forsøk viste at forbehandling med L-karnitin samtidig med fettsyrer resulterte i en økt CO_2 -produksjon fra oljesyre, mens insulinstimulert CO_2 -produksjon fra U-glukose ble redusert.

Effekten på insulinstimulert glukoseoksidasjon er i samsvar med teorien om at forbehandling med L-karnitin kan føre til økt dannelse av toksiske β -oksidasjonsprodukter [35]. Derimot fant vi at forbehandling med L-karnitin ikke førte til signifikant endring av glukosesuppresjonen (figur 3.10C).

4.5 Insulinsignaleringen

Det var av interesse å undersøke insulinsignalering i myotubene ved hjelp av Westernblotting for å se om cellenes følsomhet for insulin ble endret etter forbehandling med oljesyre, EPA og GW. Dette ble gjort for å se om eventuelle effekter kunne sammenlignes med de metabolske parameterne. Resultatene viste at forbehandling med oljesyre og EPA i 24 timer, og GW i 4 døgn ikke signifikant påvirket Akt- og ERK-fosforylering sammenlignet med kontrollceller (figur 3.15B og 3.16B). Dette er i samsvar med Aas *et al.* [28] som fant at forbehandling med 600 μ M EPA i 24 timer ikke påvirket aktiviteten av Akt til tross for at forbehandling med EPA økte insulinstimulert glukosetransport. Resultatene fra forsøkene var ikke i samsvar med effektene av forbehandlingene som ble observert i de metabolske parameterne. Dette betyr at effekten av forbehandling med EPA og linolsyre på de metabolske parameterne sannsynligvis ikke er forårsaket av effekter tidlig i insulinsignalveien.

5. Konklusjon

Muskelcellene kan variere mellom utnyttelse av fettsyrer og glukose som energisubstrat, og dette skiftet i energiutnyttelsen omtales som metabolsk fleksibilitet. I denne oppgaven viser vi at ved tilstedeværelse av glukose ble glukose foretrukket som energikilde, samtidig som fettsyreoksidasjonen ble undertrykket. Metabolsk fleksibilitet og adapterbarhet mhp. fettsyreoksidasjonen var signifikant økt etter forbehandling med EPA sammenlignet med andre behandlinger. Suppressibilitet av glukose på fettsyreoksidasjonen var også signifikant økt etter forbehandling med EPA sammenlignet med oljesyre og palmitinsyre. Forbehandling med linolsyre resulterte også i signifikant økning av suppressibilitet sammenlignet med oljesyre, og signifikant økt adapterbarhet sammenlignet med kontroll, oljesyre og GW, mens TTA og GW ga mindre klare effekter på de beregnede metabolske parameterne. Dette kan tyde på at PUFA er fordelaktig med tanke på å regulere metabolsk fleksibilitet *in vivo*, kanskje på grunn av økt lipidsyntese og dermed mindre opphoping av lipotoksiske intermediater. Det vil fremover være nødvendig å undersøke mekanismene bak de effektene vi fant etter forbehandling av celler med EPA og linolsyre.

Kildeliste

1. Smyth, S. and A. Heron, *Diabetes and obesity: the twin epidemics*. Nat Med, 2006. **12**(1): p. 75-80.
2. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 782-7.
3. Rang H.P., et al., *Pharmacology. Fifth ed*, C. Livingstone, Editor. 2003. p. 385-387.
4. Statens legemiddelverk, *Terapianbefalinger: Behandling av type 2-diabetes*. 2001. **03**: p. 1-92.
5. Shanik, M.H., et al., *Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse?* Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S262-8.
6. Younis, N., H. Soran, and S. Farook, *The prevention of type 2 diabetes mellitus: recent advances*. Qjm, 2004. **97**(7): p. 451-5.
7. Alberti, K.G., *Impaired glucose tolerance: what are the clinical implications?* Diabetes Res Clin Pract, 1998. **40 Suppl**: p. S3-8.
8. International Diabetes Federation. *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*. 2006 [cited 26.03.2008]; Available from: http://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf.
9. Fonseca, V.A., *The metabolic syndrome, hyperlipidemia, and insulin resistance. [Review] [46 refs]*. Clinical Cornerstone, 2005. **7 (2-3)**: p. 61-72.
10. Sugden MC., H.M., *Skeletal muscle lipid metabolism and the adipomuscular axis*. Future Lipidology, 2006. **1**(2): p. 153-162.
11. Hegarty, B.D., et al., *The role of intramuscular lipid in insulin resistance*. Acta Physiol Scand, 2003. **178**(4): p. 373-83.
12. Khan, A.H. and J.E. Pessin, *Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways*. Diabetologia, 2002. **45**(11): p. 1475-83.
13. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
14. Vistisen, B., et al., *Effect of gender on lipid-induced insulin resistance in obese subjects*. Eur J Endocrinol, 2008. **158**(1): p. 61-8.
15. Boden, G., *Fatty acid-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle and liver*. Curr Diab Rep, 2006. **6**(3): p. 177-81.
16. Aas, V., et al., *Lipid metabolism in human skeletal muscle cells: effects of palmitate and chronic hyperglycaemia*. Acta Physiol Scand, 2005. **183**(1): p. 31-41.
17. Savage, D.B., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 507-20.
18. Kelley, D.E., *Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1699-702.
19. Storlien, L., N.D. Oakes, and D.E. Kelley, *Metabolic flexibility*. Nutrition Society, 2004. **63**: p. 363-368.
20. Kelley, D.E., B.H. Goodpaster, and L. Storlien, *Muscle triglyceride and insulin resistance. [Review] [96 refs]*. 2002.
21. Ukropcova, B., et al., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1934-41.

22. Zierath, J.R. and Y. Kawano, *The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2003. **17**(3): p. 385-98.
23. Bevan, P., *Insulin signalling*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 8): p. 1429-30.
24. Luiken, J.J., et al., *Skeletal muscle fatty acid transport and transporters*. Int J Sport Nutr Exerc Metab, 2001. **11 Suppl**: p. S92-6.
25. Stremmel, W., et al., *A new concept of cellular uptake and intracellular trafficking of long-chain fatty acids*. Lipids, 2001. **36**(9): p. 981-9.
26. Steiber, A., J. Kerner, and C.L. Hoppel, *Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective*. Mol Aspects Med, 2004. **25**(5-6): p. 455-73.
27. Gaster, M., A.C. Rustan, and H. Beck-Nielsen, *Differential utilization of saturated palmitate and unsaturated oleate: evidence from cultured myotubes*. Diabetes, 2005. **54**(3): p. 648-56.
28. Aas, V., et al., *Eicosapentaenoic acid (20:5 n-3) increases fatty acid and glucose uptake in cultured human skeletal muscle cells*. J Lipid Res, 2006. **47**(2): p. 366-74.
29. Storlien, L.H., et al., *Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats*. Science, 1987. **237**(4817): p. 885-8.
30. Gudbrandsen, O.A., et al., *The metabolic effects of thia fatty acids in rat liver depend on the position of the sulfur atom*. Chem Biol Interact, 2005. **155**(1-2): p. 71-81.
31. Berge, R.K., et al., *The metabolic syndrome and the hepatic fatty acid drainage hypothesis*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 15-20.
32. Evans, R.M., G.D. Barish, and Y.X. Wang, *PPARs and the complex journey to obesity*. Nat Med, 2004. **10**(4): p. 355-61.
33. Kramer, D.K., et al., *Direct activation of glucose transport in primary human myotubes after activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta*. Diabetes, 2005. **54**(4): p. 1157-63.
34. Power, R.A., et al., *Carnitine revisited: potential use as adjunctive treatment in diabetes*. Diabetologia, 2007. **50**(4): p. 824-32.
35. Koves, T.R., et al., *Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance*. Cell Metab, 2008. **7**(1): p. 45-56.
36. Gaster, M., et al., *A cellular model system of differentiated human myotubes*. Apmis, 2001. **109**(11): p. 735-44.
37. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 961-7.
38. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
39. Pan, D.A., et al., *Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action*. Diabetes, 1997. **46**(6): p. 983-8.
40. Storlien, L.H., et al., *Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats*. Am J Physiol, 1986. **251**(5 Pt 1): p. E576-83.
41. Moro, C., S. Bajpeyi, and S.R. Smith, *Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: implications for insulin sensitivity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(2): p. E203-13.
42. Blaak, E.E., *Basic disturbances in skeletal muscle fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus*. Proc Nutr Soc, 2004. **63**(2): p. 323-30.

-
43. Turcotte, L.P., J.R. Swenberger, and A.J. Yee, *High carbohydrate availability increases LCFA uptake and decreases LCFA oxidation in perfused muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(1): p. E177-83.
 44. Jeukendrup, A.E., *Regulation of fat metabolism in skeletal muscle*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **967**: p. 217-35.
 45. Manco, M., et al., *Insulin resistance directly correlates with increased saturated fatty acids in skeletal muscle triglycerides*. Metabolism, 2000. **49**(2): p. 220-4.

Appendiks

Celledyrking

Utsåingsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-1

50 ml FCS (føtalt kalveserum)

2,5 ml Penicilin-Streptomycin (10 000 enheter/ml)

2,5 ml Fungizone[®] (250 µg/ml amfotericin B)

Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-1

10 ml FCS (føtalt kalveserum)

10 ml Ultroser G

2,5 ml Penicilin-Streptomycin (10 000 enheter/ml- 10 000 mg/ml)

2,5 ml Fungizone[®] (250 µg/ml amfotericin B)

Differensieringsmedium

500 ml DMEM m/GLUTAMAX-1

10 ml FCS (føtalt kalveserum)

2,5 ml Penicilin-Streptomycin (10 000 enheter/ml- 10 000 mg/ml)

2,5 ml Fungizone[®] (250 µg/ml amfotericin B)

25 pmol insulin (21 µl av 1000 x fortynning av Insulin Actrapid[®] Penfill 0,6 mM)

*“Mulitwell fuel handling”***Høstebuffer (PBS)**

8 g NaCl

0,2 g KH_2PO_4

2,9 g Na_2HPO_4

0,2 g KCl

1000 ml dH_2O tilsettes

pH justeres til 7,2-7,4 med HCl.

Fargeløst differensieringsmedium

8,3 g DMEM base pulver

3,7 g NaHCO_3

20 ml FCS

20 ml L-glutamin

5 ml Fungizone

5 ml Pencilin/Streptomycin

50 pmol insulin (42 μl av 1000 x fortynnet insulin Actrapid[®] Penfill)

110 mg Natrium pyruvat

950 ml dH_2O tilsettes

pH justeres til 7,2-7,3 og sterilfilteres

*Westernblotting***2x Sample buffer**

6,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH6,8

7,5 ml 100 % Glycerol

5 ml 10 % SDS

Justeres med dH_2O opptil 50 ml

2x Laemmlibuffer

2x Sample buffer

10 % β -mercaptoetanol

5 % bromfenolblått

12% Polyakrylamid gel (2 stk)

4,36 ml dH₂O

3,25 ml gelbuffer (1,5 M Tris-Cl pH 8,8)

5,20 ml Monomer løsning (akrylamid)

130 μ l SDS løsning (10%)

65 μ l Ammonium persulfat (10%)

6,5 μ l TEMED

4 % Stack-gel

6,10 ml dH₂O

2,50 ml stackgelbuffer (0,5 M Tris-Cl pH 6,8)

1,30 ml Monomer løsning (akrylamid)

100 μ l SDS løsning (10%)

50 μ l Ammonium persulfat (10%)

10 μ l TEMED

Gel buffer, 1,5 M Tris-Cl

45,3 g Tris base

Til 250 ml dH₂O

pH justeres til 8,8 med konsentrert HCl, sterilfiltreres og avgasses

Stackgel buffer, 0,5 M Tris-Cl

15,1 g Tris base

Til 250 ml dH₂O

pH justeres til 6,8 med konsentrert HCl, sterilfiltreres og avgasses

SDS 10 %

10 g SDS

Til 100 ml dH₂O

Ammonium persulfat 10 %

5 g Ammonium persulfat

Til 50 ml dH₂O

Bromfenolblått 0,5 %

Bromfenolblått 0,5 %

10 % etanol

Elektroforesebuffer

0,025 M Tris base (7,6 g)

0,192 M Glycine (36 g)

0,1 % SDS (2,5 g)

Til 2,5 L dH₂O

Blottebuffer/Towbin buffer

25 mM Tris base (3 g)

192 mM Glycine (14,4 g)

0,02 % SDS (0,2 g)

Løses i ca. 600 ml dH₂O

200 ml Metanol

Justeres med dH₂O opptil 1 L

T-TBS (Tween –Trisbufret saltløsning) (2 L)

10mM Tris base (2,42 g)

100mM NaCl (11,68 g)

Løses i ca 1,8 L dH₂O

pH justeres til 7,5 med konsentrert HCl

Justeres med dH₂O opptil 2 L

0,05 % Tween 20 (1 ml)

Blotto

T-TBS tilsettes 50 g/L tørrmelk (fettfri)

Varmes opp under omrøring, og filtreres gjennom Whatman 4 filterpapir

Prosedyre for Western immunblotting

Støping av gel

Lag 12 % gel, bland løsningen og tilsett i støpeformen som er satt sammen på forhånd

Tilsett 200 µl isobutanol på hver gel

La stå i cirka 45- 60 minutter

Skyll bort isobutanol med dH₂O

Lag 4 % stackgel og etterfyll støpeformen med gel

Sett i former (kammer)

La stå i cirka 45-60 minutter

Ta platene fra hverandre og vask gelene med dH₂O

Gelene kan enten pakkes inn med fuktig papir og lagres i kjøleskap, eller brukes direkte i forsøk.

Gelelektroforese

Sett gelene på plass i gelbadet og kople til kjøleslangene

Hell elektroforesebuffer bak og i karet

Sett på brønnmarkører og ta forsiktig ut kammene

Tilsett standard og utregnende mengde prøve

Fjern brønnmarkørene

Sett på strømlokket og sett på program med 200 V i 80 minutter

Stopp gel-kjøringen når fargebåndene har kommet helt ned

Blotting

Fukt blottepapir, membran og celofan i blottebuffer (Towbin buffer/ transferbuffer)

Legg strømstanser i bunnen av blottemaskinen

Lag sandwich etter Hoefer metoden (semidry blotting). 2 geler: 3 blottepapir –membran - gel -3 blottepapir. 4 geler: 3 blottepapir- membran- gel- celofan – 1 blottepapir- membran - gel- 3 blottepapir

Legg på lokket, og kople blottemaskinen til stømuttak

Kjør blottemaskinen ved 32 mA (per gel) i 1 time

Farg ferdig blott i Ponceu-farge i 1 minutt og skyll i dH₂O. Ta kopi av membranene mellom to overheadark for å ha et bilde av mengden protein i hver prøve

Deteksjon

Legg membranene i dH₂O i noen minutter og deretter 10 minutter i T-TBS på vipping

Blokk membranen i 10 ml blotto i 60 minutter ved romtemperatur og vipping

Hell av blokkerløsningen

Tilsett 10 ml per membran av primær antistoff (P-Akt fortynnet i blotto, 1:1000, P-ERK fortynnet i blotto, 1:2000)

Inkuber over natt på kjølerom og vipping

Vask 4 x 10 minutter med blotto ved romtemperatur og vipping

Løs peroksydasemerket sekundært antristoff (Geit-anti-kanin:1:3000, Geit-anti-mus:1:1500) i blotto, inkuber i 60 minutter ved romtemperatur og vipping

Vask 2 x 5 minutter i blotto ved romtemperatur og vipping

Skyll membranen 2 ganger med T-TBS. Vask deretter 3 x 5 minutter med T-TBS ved romtemperatur og vipping

Mørkerom: Lag på forhånd:

Fremkaller: 120 ml fremkaller + 280 ml sprinvann

Fix: 120 ml fix + 280 ml springvann

Lag ELC- reagens, bland 4 ml fra hver flaske i et kar og inkuber membranene 1 minutt i romtemperatur og bevegelse. Pakk membranene i plastfolie med proteinsiden ned.

Legg film og membran sammen i bok til eksponering i 1 minutt

Legg film over i fremkaller i cirka 30 sekunder til filmen blir grå.

Skyll i vann

Legg filmen over i fix i 5 minutter

Skyll filmen i vann og heng opp filmen til tørk

Westerblott skannes inn på datamaskinen og behandles av dataprogrammet GeneTools from SynGene.